

Charakterisierung modularer Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
- Doktor der Naturwissenschaften -
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker

Raimund Maier

Bayreuth
2014

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden von April 1998 bis August 2002 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Franz X. Schmid angefertigt. Die vorliegende schriftliche Version dieser Dissertation entstand von August 2012 bis Februar 2014.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 12. März 2014

Zulassung durch die Promotionskommission: 19. März 2014

Wissenschaftliches Kolloquium: 03. Juli 2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Rhett Kempe

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Franz Xaver Schmid (Erstgutachter)

Prof. Dr. Clemens Steegborn (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Carlo Unverzagt (Vorsitz)

Prof. Dr. Wolfgang Schumann

1. Einleitung.....	1
1.1. Das Faltungsproblem.....	1
1.2. Molekulare Chaperone	3
1.3. Protein-Disulfid-Isomerasen.....	4
1.4. Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerasen	5
1.4.1. Die Peptidyl-Prolylbindung.....	5
1.4.2. Entdeckung der Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase	6
1.4.3. Die Cyclophilin-Familie.....	7
1.4.4. Die FKBP-Familie.....	7
1.4.5. Die Parvuline.....	8
1.4.6. Der Trigger-Faktor	9
1.5. RNase T1 als Modellsystem für prolinlimitierte Proteinfaltung	11
1.6. Problemstellung	13
2. Materialien und Methoden	15
2.1. Materialien.....	15
2.1.1. Bakterienstämme	15
2.1.2. Plasmide	15
2.1.3. Oligodesoxyribonukleotide	16
2.1.4. Nährmedien	16
2.1.5. Enzyme, Proteine und Peptide	17
2.1.6. Chemikalien	17
2.1.7. Geräte	19
2.1.8. Verbrauchsmaterialien und Kits	20
2.1.9. Computerprogramme.....	20
2.2. Elektrophoretische Methoden.....	20
2.2.1. Agarose Gelelektrophorese	20
2.2.2. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.3. Molekularbiologische Methoden.....	21
2.3.1. Isolierung von Plasmiden vom Typ pQETF.....	21
2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.3.3. Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>E.coli</i> Zellen	22
2.3.4. Lagerung transformierter Bakterien als Glycerinkulturen	23
2.4. Gewinnung von Proteinen und Ribosomen	23
2.4.1. Gewinnung von (S54G/P55N)RNase T1 aus <i>E. coli</i> DH5α	23
2.4.2. Gewinnung des Trigger-Faktors aus <i>E. coli</i>	23
2.4.3. Isolierung von 70S-Ribosomen aus <i>E.coli</i> JC7623Δ <i>tig</i>	24
2.5. Modifikation von Proteinen.....	25
2.5.1. Reduktion und Carboxymethylierung/Carbamidomethylierung	25
2.5.2. Fluoreszenzmarkierung cysteinhaltiger Trigger-Faktorvarianten	25

2.6. Spektroskopische Methoden.....	26
2.6.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	26
2.6.2. Fluoreszenzemissionsspektren	26
2.6.3. Circular dichroismus-Spektren.....	27
2.7. Proteasegekoppelter Prolylisomerasetest.....	27
2.8. Faltungsexperimente mit RCM-T1 und apo-Lactalbumin	28
2.8.1. Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch PPIasen	28
2.8.2. Katalyse der Rückfaltung von RCAM-T1(4X) durch PPIasen.....	29
2.8.3. Inhibition von Trigger-Faktor durch entfaltete Proteine	29
2.8.4. Entfaltung von RCM-T1 durch Trigger-Faktor	30
2.8.5. Verlangsamung der Faltung von RCM-T1 durch Trigger-Faktor.....	31
2.8.6. Verlangsamung der Rückfaltung von apo- α -Lactalbumin durch Trigger-Faktor	31
2.9. Bindungseigenschaften des Trigger-Faktors.....	32
2.9.1. Kinetik der Substratbindung und -freisetzung des Trigger-Faktors.....	32
2.9.2. Substratspezifität des Trigger-Faktors: Bindungsstellen in einer Peptidbibliothek.....	33
2.9.3. Analytische Ultrazentrifugation zur Selbstassoziation von Trigger-Faktor.....	35
2.9.4. Ribosomenbindung des Trigger-Faktors	35
2.10. Chaperontest: Chemisch induzierte Aggregation von Citratsynthase	37
3. Ergebnisse und Diskussion.....	39
3.1. Der Trigger-Faktor.....	39
3.1.1. Substratbindung und -freisetzung des Trigger-Faktors sind schnelle Reaktionen.....	40
3.1.1.1. Komplexbildung zwischen RCM- α -Lactalbumin und Trigger-Faktor.....	40
3.1.1.2. Dissoziation des Komplexes zwischen RCM- α -Lactalbumin und Trigger-Faktor ...	45
3.1.1.3. Komplexbildung zwischen RCM-(P39A)-T1 und Trigger-Faktor	46
3.1.1.4. Die Substratbindung des Trigger-Faktors ist unabhängig von Nukleotiden	47
3.1.2. Substratspezifität des Trigger-Faktors: Bindungsstellen in RCM-La und RCM-T1	49
3.1.3. Trigger-Faktor besitzt klassische Chaperoneigenschaften.....	53
3.1.4. Trigger-Faktor bildet Dimere	55
3.1.5. Trigger-Faktor bewirkt die Entfaltung eines Proteins mit geringer Stabilität	56
3.1.6. Trigger-Faktor verlangsamt konformationelle Faltungsschritte	59
3.1.6.1. Verlangsamung der Rückfaltung von apo- α -Lactalbumin	59
3.1.6.2. Verlangsamung der Rückfaltung von RCM-T1	62
3.1.7. Die Wechselwirkung des Trigger-Faktors mit dem Ribosom.....	65
3.1.7.1. Fluoreszenzmarkierung des Trigger-Faktors an Position 14.....	66
3.1.7.2. Kinetik der Ribosomenbindung von fluoreszenzmarkiertem Trigger-Faktor	68
3.1.7.3. Die Dissoziation des Trigger-Faktor-Ribosomen-Komplexes erfolgt sehr langsam.	70
3.1.7.4. Konzentrationsabhängigkeit der Bindungskinetik	71
3.1.7.5. Verdrängung des markierten Trigger-Faktors vom Ribosom durch Wildtyp-Trigger-Faktor	73
3.1.7.6. Ribosomenbindung von Trigger-Faktor mit Fluoreszenzmarkierung an Position 30	76
3.1.8. Der Trigger-Faktor aus <i>Thermotoga maritima</i>	79

3.2. Charakterisierung weiterer Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerasen.....	85
3.2.1. SlyD.....	88
3.2.1.1. SlyD [*] als Faltungshelfer	89
3.2.1.2. scSlyD ₂ als Faltungshelfer	91
3.2.1.3. scSlyD ₂ [*] als Chaperon	93
3.2.2. FkpA.....	95
3.2.2.1. FkpA als Faltungshelfer	95
3.2.2.2. Isomeraseaktivität des Fusionskonstrukts MBP-gp41 [*] -FkpA	98
3.2.2.3. scFkpA ₂ als Faltungshelfer	99
3.2.2.4. scFkpA ₂ als Chaperon	100
3.2.3. TcFKBP18.....	102
3.2.4. NcFKBP22	104
3.2.5. SurA	108
4. Zusammenfassende Diskussion.....	117
4.1. Substratbindungseigenschaften bestimmen die Aktivität des Trigger-Faktors	117
4.2. Die Ribosomenwechselwirkung des Trigger-Faktors.....	121
4.3. Die Struktur des Trigger-Faktors.....	122
4.4. SurA ähnelt Trigger-Faktor in vielen Eigenschaften.....	124
4.5. Zahlreiche weitere PPIasen haben einen modularen Aufbau	125
4.6. Prolylisomerase oder Chaperon?	127
5. Zusammenfassung.....	129
6. Summary.....	131
7. Publikationsliste	133
8. Abkürzungsverzeichnis	134
9. Literaturverzeichnis	137
10. Anhang.....	147

1. Einleitung

1.1. Das Faltungsproblem

Proteine nehmen *die* zentrale Stellung in allen lebenden Organismen ein. Sie machen etwa die Hälfte der Trockenmasse von Zellen aus und erfüllen vielfältige biologische Aufgaben wie Katalyse, Transport, Bewegung, Speicherung, Signalleitung oder Regulation. Trotz dieser breitgefächerten Aufgabenpalette werden alle Proteinmoleküle aus lediglich 20 bzw. 22 verschiedenen L- α -Aminosäuren¹ aufgebaut, die der Vorgabe einer Gensequenz folgend linear über Säureamidbindungen miteinander verknüpft werden. Diese Aminosäuresequenz wird als Primärstruktur des Proteins bezeichnet.

Grundvoraussetzung für die Funktionalität der Proteine ist die Ausbildung einer definierten räumlichen Struktur der gesamten Proteinkette. Diese native räumliche Struktur wird als „Proteinfaltung“ bezeichnet. Alternativ bezeichnet der Begriff „Proteinfaltung“ den kinetischen Prozess dieser Strukturbildung ausgehend von der ungefalteten Aminosäurekette zum fertig gefalteten Protein. In Rückfaltungsexperimenten mit Ribonuklease A konnten Anfinsen und Mitarbeiter schon in den 1960er Jahren zeigen, dass die vollständige Information für die dreidimensionale Struktur eines Proteins bereits in seiner Aminosäuresequenz enthalten ist (Haber & Anfinsen 1961; Haber & Anfinsen 1962; Anfinsen 1973). Diese Codierung der Faltungsinformation in der linearen Proteinsequenz wird als „zweite Hälfte des genetischen Codes“ bezeichnet (Goldberg 1985). Auch nach einem halben Jahrhundert intensiver Forschung ist es noch nicht gelungen, die Umsetzung dieses linearen Codes in eine dreidimensionale Struktur auf molekularer Ebene zu verstehen. Durch die Aufklärung von nahezu einhunderttausend Proteinstrukturen und besonders durch Studien zur *in-vitro*-Faltung kleiner Proteine ist heutzutage jedoch bekannt, welche Arten molekularer Wechselwirkungen für die energetische Stabilität des gefalteten Proteins verantwortlich sind.

Neben einem hohen Grad struktureller Ordnung ist für die Funktionalität der meisten Proteine jedoch auch konformationelle Flexibilität notwendig. Proteine erfüllen diese gegensätzlichen Anforderungen dadurch, dass ihr nativer Zustand energetisch nur geringfügig stabiler ist als der entfaltete. So ist die freie Enthalpie der Entfaltung meist kleiner als 70 kJ/mol (Jaenicke 1987; Jaenicke 1996). Es ist daher bemerkenswert, wie eine Proteinkette ihre native Struktur trotz ihrer geringen Stabilität von einer nahezu unendlichen Zahl an möglichen entfalteten Ausgangszuständen aus so schnell und effizient erreichen kann. Schon früh erkannte Cyrus Levinthal, dass eine rein thermodynamisch kontrollierte zufällige Suche nach dem energetisch günstigsten Zustand viel zu lange dauern würde. Bereits bei einem kleinen Protein von 100 Aminosäuren würde solch eine statistische Strukturfindung nach seinen Berechnungen länger dauern als die bisherige Lebensdauer des Universums (Levinthal 1969). Die Faltung der

¹bisweilen werden Selenocystein und Pyrrolysin als 21. und 22. proteinogene Aminosäuren gezählt.

meisten Proteine spielt sich jedoch im Zeitfenster von Millisekunden bis Minuten ab. Diese Diskrepanz ging als „Levinthal-Paradoxon“ in die Geschichte der Erforschung der Proteinfaltung ein. Levinthal schlug damals die Existenz konkreter Faltungswege mit teilgefalteten Zwischenprodukten vor, wodurch der Konformationsraum einer faltenden Peptidkette rasch in Richtung der nativen Struktur hin eingeschränkt wird (Levinthal 1968; Kim & Baldwin 1982; Kim & Baldwin 1990). Derartige Faltungsintermediate sind weniger stabil als der native Zustand. Sie können nur beobachtet werden, wenn sie vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Faltungsweges liegen (Creighton 1990; Matthews 1993). Echtzeituntersuchungen haben gezeigt, dass viele entfaltete Proteinketten im Bereich weniger Millisekunden zu kompakten Intermediaten mit nativ-ähnlicher Sekundärstruktur kollabieren können, die *molten globules* genannt werden (Roder *et al.* 1988; Udgaonkar & Baldwin 1988).

Nach wie vor ist unklar, ob es sich bei diesen *molten globules* um produktive Zwischenstufen handelt, die wie von Levinthal beschrieben die verschiedenen Faltungswege in Richtung der nativen Struktur bündeln. Ebenso könnte es sich um die Ergebnisse unproduktiver Faltungswege handeln, die Proteinmoleküle vorübergehend in „kinetischen Fallen“ enden lassen (Baldwin 1996). Jedenfalls gibt es mehrere Beispiele insbesondere kleinerer Proteine, deren gesamte Faltung bis zur nativen Struktur im unteren Millisekundenbereich ohne nachweisbare Zwischenstufen abläuft (Jackson & Fersht 1991; Schindler *et al.* 1995).

In vielen Fällen häufen sich bei der *in-vitro*-Faltung Intermediate vor verhältnismäßig langsamen Faltungsschritten an. Häufig sind diese Schritte *cis-trans*-Isomerisierungen von Peptidyl-Prolylbindungen, Disulfidbrückenbildungen oder die Assoziation einzelner Proteinuntereinheiten. Derartige langsame Reaktionen führen häufig zu Ausbeuteverlusten bei Rückfaltungsexperimenten, da langlebige Faltungsintermediate mit ihren teilweise oberflächenexponierten hydrophoben Aminosäureresten bereits bei niedrigen Konzentrationen zu Aggregation neigen (Seckler & Jaenicke 1992). Zusätzlich begünstigen hohe Temperaturen und Proteinkonzentrationen diese unerwünschte Nebenreaktion.

Im Vergleich zu typischen *in-vitro*-Faltungsexperimenten muss die Proteinfaltung in lebenden Organismen meist bei deutlich höheren Temperaturen stattfinden. Außerdem liegt die Konzentration an faltenden Proteinen in Zellen mit ca. 40 μM relativ hoch (Ellis & Hartl 1996). Beides birgt für die Zelle erhebliche Gefahr: Einerseits wäre ein hoher Verlust an Faltungsausbeute durch Aggregation enorm unwirtschaftlich, da die Neusynthese von Polypeptidketten mit hohem energetischen Aufwand verbunden ist. Zum anderen können Aggregate strukturell fehlerhafter Proteine zahlreiche schwere Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington oder Katarakt (grauer Star) verursachen (Lyubchenko *et al.* 2010; Wang & King 2010).

Die Natur begegnet dem Aggregationsproblem mit zwei Strategien: der Evolution von Aminosäuresequenzen, die zu einer möglichst schnellen verlustfreien Faltung fähig sind, und

der Entwicklung eines Proteinapparats, der die Faltungsausbeute erhöht. Solche Faltungshelfer-Proteine arbeiten auf zweierlei Wegen: Molekulare Chaperone binden reversibel teilgefaltete Proteine und schützen diese so vor Aggregation. Faltungskatalysatoren wie Protein-Disulfid-Isomerasen oder Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen verkürzen die aggregationsgefährdeten Phasen der Faltung durch Katalyse potentiell langsamer Faltungsschritte.

1.2. Molekulare Chaperone

Chaperone (engl./frz. „Anstandsdamen“) bezeichnen eine Klasse ubiquitärer Proteine, die andere Proteine beim Erreichen Ihrer nativen Struktur unterstützen, ohne selbst Teil dieser Endstruktur zu sein (Ellis & van der Vies 1991). Sie stabilisieren teilgefaltete oder entfaltete Strukturen durch vorübergehende Bindung und verhindern so analog zur historischen Anstandsdame unerwünschte, als „schädlich“ empfundene Kontakte. Auf diese Weise werden Aggregationsprozesse als Konkurrenzreaktionen der Faltung vermieden (Buchner 1996; Hartl 1996). Chaperone beschränken sich in Ihrer Aktivität nicht auf bestimmte Zielmoleküle, sondern sie erkennen ihre „Substrate“ an Strukturelementen, die typisch für entfaltete und teilgefaltete Proteine sind (Landry *et al.* 1992). Chaperone beschleunigen nicht elementare Faltungsschritte wie die in den folgenden Kapiteln besprochenen Faltungskatalysatoren, sondern bewirken lediglich eine erhöhte Faltungsausbeute.

Die Expression vieler Chaperone nimmt unter Stressbedingungen wie beispielsweise extremen Temperaturen oder oxidativem Stress deutlich zu. Viele von ihnen gehören daher zur Klasse der so genannten „Hitzeschockproteine“ (Hsp).

Auch in Abwesenheit von Stressbedingungen treten im Lebenszyklus der meisten Proteine besonders „sensible“ Phasen auf. So beginnt die Proteinfaltung bisweilen deutlich bevor das Ribosom die komplette Polypeptidkette synthetisiert hat. Da aber für eine korrekte Faltung die Sequenzinformation einer vollständigen Faltungsdomäne nötig ist, muss ein verfrühter Faltungsbeginn unterbunden werden. Chaperone der Hsp70-Familie erkennen exponierte hydrophobe Regionen neu synthetisierter Peptide und binden reversibel an die entstehende Kette (Beckmann *et al.* 1990). Dadurch werden die hydrophoben Oberflächen vor Aggregation geschützt und die Zeit, in der eine korrekte Faltung noch nicht möglich wäre, wird überbrückt.

Chaperone der Hsp60-Familie binden ebenfalls reversibel unkorrekt gefaltete Proteine. Sie stellen einen vom Cytosol abgetrennten Reaktionsraum („Anfinsen-Cage“) zur Verfügung, so dass ebenfalls die Aggregationsgefahr minimiert wird. GroEL, ein Mitglied der Hsp60-Familie, ist in der Lage, aufgrund bevorzugter Bindung eines weniger strukturierten Zustands, labile Proteine/Intermediate zu entfalten (Walter *et al.* 1996). Somit sind Chaperone in der Lage, fehlgefaltete Intermediate durch teilweise Entfaltung wieder auf den „richtigen“ Faltungsweg zurückführen und so die Faltungsausbeute zu erhöhen.

Nach der Energie (ATP) verbrauchenden Freisetzung eines ungefalteten Proteins von den Chaperonen der Hsp60- und Hsp70-Familien können sich neben der unmittelbaren Faltung zur nativen Struktur auch andere Prozesse anschließen, beispielsweise die erneute Bindung an das gleiche Chaperon, die Translokation durch Membranen (Sanders *et al.* 1992), Assoziation mit anderen Untereinheiten (Cheng *et al.* 1989) oder proteolytischer Abbau (Kandror *et al.* 1994). An vielen dieser Prozesse sind weitere molekulare Chaperone beteiligt. Daher kommen Chaperone unter allen Wachstumsbedingungen und in allen Zellkompartimenten vor, in denen Proteinfaltung stattfindet.

1.3. Protein-Disulfid-Isomerasen

Disulfidbrücken innerhalb einer Proteinuntereinheit oder auch zwischen verschiedenen Untereinheiten stabilisieren die dreidimensionale Proteinstruktur durch Schaffung zusätzlicher kovalenter Bindungen. Diese sind energetisch deutlich stabiler als beispielsweise Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Die Bildung einer Disulfidbrücke ist ein Redoxprozess, der die Gegenwart eines entsprechenden Redoxpartners erfordert. Daher würde diese Reaktion ohne katalysierende Enzyme meist relativ langsam ablaufen.

Bei Gegenwart mehrerer Thiolgruppen besteht weiterhin die Gefahr der Ausbildung falscher Disulfidbrücken, die ein Protein dann auf einem unproduktiven Faltungsweg festhalten würden. Zellen benötigen daher Isomeraseenzyme, die eine „Umknüpfung“ fehlerhafter Disulfidbrücken ermöglichen. Thiol-Oxidasen, -Reduktasen und Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) bzw. Disulfid-Oxidoreduktasen katalysieren die Ausbildung und Umlagerung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinseitenketten (Freedman *et al.* 1994).

Vor über 50 Jahren wurde die erste eukaryontische PDI im Lumen des ER entdeckt und gereinigt (Goldberger *et al.* 1963). Die damals von Anfinsen und Mitarbeitern vertretene These, die PDI katalysiere den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Disulfidbrückenbildung bei der oxidativen *de-novo*-Faltung sekretorischer Proteine (Epstein *et al.* 1963), wurde seitdem durch zahlreiche Forschungsergebnisse bestätigt (Roth & Pierce 1987; Bulleid & Freedman 1988; Schönbrunner & Schmid 1992). Während diese PDI die Funktionen einer Thiol-Oxidase und Disulfid-Isomerase in sich vereinigt, treten beide Aktivitäten oft auch getrennt voneinander auf: In gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli* sind analog zur eukaryontischen PDI die Enzyme DsbA, DsbB und DsbC in einer periplasmatischen Redoxkette für die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken verantwortlich (Bardwell & Beckwith, 1993). Während DsbA in Kooperation mit DsbB als Thiol-Oxidase Disulfidbrücken knüpft, fungiert DsbC als Disulfid-Isomerase, die fehlgebildete Disulfidbrücken reorganisiert.

1.4. Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen

1.4.1. Die Peptidyl-Prolylbindung

Die Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren besitzt aufgrund der Mesomeriestabilisierung der CO-NH-Bindung partiellen Doppelbindungscharakter und ist daher nahezu planar. Zwei aufeinanderfolgende C $_{\alpha}$ -Atome können daher zueinander *cis*- oder *trans*-Konformation einnehmen. Da sich die C $_{\alpha}$ -Atome mit den daran hängenden Aminosäureseitengruppen und den von dort aus weiter verlaufenden Peptidketten in der *cis*-Stellung sterisch behindern, findet man in Peptidbindungen ohne Prolinbeteiligung nahezu ausschließlich *trans*-Peptidbindungen. In unstrukturierten Peptiden liegt daher der *cis*-Gehalt deutlich unter 0,1 % (Ramachandran & Mitra 1976; Scherer *et al.* 1998). Allerdings wurden in den Strukturen nativer Proteine vereinzelt auch nicht-prolinhaltige *cis*-Peptidbindungen gefunden (Stewart *et al.* 1990; Jabs *et al.* 1999).

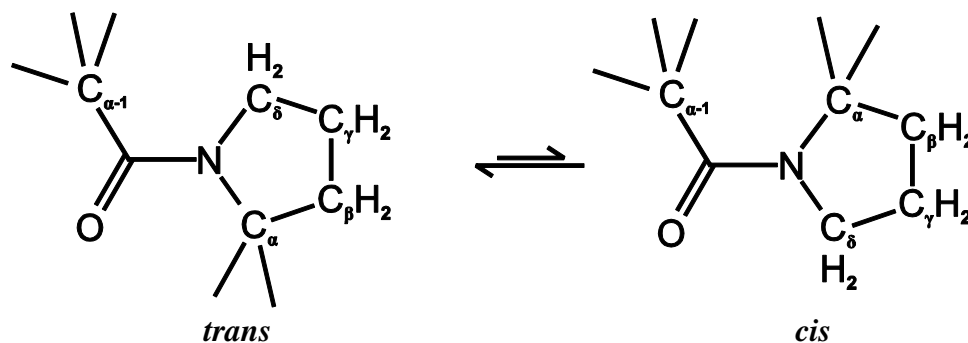


Abb. 1-1: *cis-trans*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindungen. Das Gleichgewicht liegt zu 70 bis 90 % auf der Seite der *trans*-Konformation; die Aktivierungsenergie der Isomerisierung liegt aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung bei ca. 80 kJ mol $^{-1}$.

Prolin nimmt als Iminosäure innerhalb der proteinogenen Aminosäuren eine Sonderstellung ein: Infolge des Ringschlusses zwischen Seitenkette und Amidstickstoff bildet sich ein Pyrrolidinring. Somit befindet sich das C $_{\alpha}$ der Aminosäure vor Prolin immer *cis*-ständig zu einem Kohlenstoffatom des Prolins (C $_{\alpha}$ oder C $_{\delta}$), was zu einer vergleichbaren sterischen Behinderung bei *cis*- und *trans*-Isomeren führt (Abb. 1-1). Das *trans*- ist dem *cis*-Isomer gegenüber daher energetisch nur schwach begünstigt. Somit liegen in unstrukturierten Oligopeptiden beide Isomere im Gleichgewicht vor, wobei der *cis*-Gehalt je nach Lösungsmittel und vorhergehender Aminosäure zwischen 10 und 30 % liegt (Cheng & Bovey 1977; Grathwohl & Wüthrich 1981; Reimer *et al.* 1998). Wegen des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung ist die *cis-trans*-Isomerisierung eine sehr langsame Reaktion mit einer Aktivierungsenergie von etwa 80 kJ/mol (Brandts *et al.* 1975) und einer Zeitkonstanten (bei Raumtemperatur) im Bereich von 10 bis 100 s.

Aufgrund struktureller Zwänge bildet jede Xaa-Prolylpeptidbindung² im gefalteten Protein meist nur eine einzige definierte Konformation aus, wobei die *cis*-Konformation in etwa 7 %

²künftig verkürzt mit Prolylbindung bezeichnet

aller Fälle angenommen wird (Stewart *et al.* 1990; MacArthur & Thornton 1991). Es gibt aber auch einige wenige Proteine, bei denen im nativen Zustand ein Gleichgewicht zwischen *cis*- und *trans*-Konformation herrscht, z. B. in Staphylokokkennuklease (Evans *et al.* 1987) oder Calbindin (Chazin *et al.* 1989). In besonderen Fällen kommt der Prolylbindung eine „Schalterfunktion“ zu, so dass der Funktionszustand eines Proteins davon abhängt, ob eine bestimmte Prolylbindung gerade in *cis* oder *trans* vorliegt (Andreotti 2003; Eckert 2007; Jakob & Schmid 2008).

In ungefalteten Proteinen kann sich wie in kurzen Oligopeptiden für jede Prolylbindung ein Gleichgewicht zwischen *cis*- und *trans*-Isomer ausbilden. Ein Protein mit n Prolinen bildet nach Entfaltung also theoretisch 2^n verschiedene Isomere aus, die sich in ihrem Faltungsverhalten unterscheiden. Häufig können nur diejenigen Proteinmoleküle schnell falten, in denen die korrekten Prolyl-Isomere des nativen Zustandes vorhanden sind. Moleküle mit nicht-nativen Prolylbindungen müssen bei der Faltung die meist langsamen Prolylisomerisierungen durchlaufen. Jedoch führen nicht-native Isomere nicht zwingend zu einer Faltungsverzögerung. In vielen Proteinen mit bestimmten nicht-nativen Prolylbindungen kann durch rasche Ausbildung von nativähnlichen Strukturen die Aktivierungsenergie der *cis-trans*-Isomerisierung herabgesetzt, manchmal aber auch erhöht werden (Cook *et al.* 1979; Schmid & Blaschek 1981; Goto & Hamaguchi 1982; Kelley & Stellwagen 1984; Kelley & Richards 1987; Kiefhaber *et al.* 1990b; Kiefhaber *et al.* 1992). Je nach Protein verzögert die *cis-trans*-Isomerisierung nicht-nativer Prolylbindungen die (Rück-)Faltung im Bereich von Millisekunden bis Minuten, bisweilen sogar Stunden. Faltungsintermediate, die sich in diesem Zeitfenster anhäufen, sind aggregationsanfällig und daher - wie schon beschrieben - ungünstig für die Zelle.

1.4.2. Entdeckung der Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase

Ende der 1970er Jahre wurde die Hypothese, dass die langsamen Schritte bei der Protein-denaturierung (und somit auch Renaturierung) von der *cis-trans*-Isomerie der Prolylbindungen bewirkt werden könnten (Brandts *et al.* 1975), durch Experimente mit mehreren Proteinen bestätigt (Schmid & Baldwin 1978). Es wurde daher die Existenz von Enzymen angenommen, welche die Prolylisomerisierung katalysieren können.

Eine der Hauptschwierigkeiten bei der Suche nach Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen war lange Zeit das Fehlen einer geeigneten Sonde für Prolylisomeraseaktivität. Fischer und Mitarbeiter erarbeiteten ein Testsystem, das die isomerspezifische Proteolyse eines chromogenen Oligopeptids durch Chymotrypsin nutzt. Mit Hilfe dieses Systems gelang ihnen die Identifizierung der 17,7 kDa schweren Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPI) aus Schweinenierenextrakt (Fischer *et al.* 1984). Seit 1987 erstmals *in vitro* nachgewiesen wurde, dass dieses

Enzym auch die prolinlimitierte³ Faltung von Proteinen katalysieren kann (Lang *et al.* 1987), galt eine physiologische Rolle der PPI als Faltungshelfer als sehr wahrscheinlich. Allerdings können nicht alle prolinlimitierten Faltungsschritte durch Peptidyl-Prolyl-Isomerase beschleunigt werden (Lang *et al.* 1987; Lin *et al.* 1988). Insbesondere die schnelle Ausbildung von Faltungsintermediaten kann den Zugang für das Enzym sterisch erschweren und so eine effektive Katalyse verhindern. Eine fehlende Faltungsbeschleunigung bei Zugabe von PPI schließt daher einen prolinlimitierten Faltungsschritt nicht zwingend aus.

Im Laufe der Jahre wurden zahlreiche weitere Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen (kurz: PPIasen) identifiziert. Dabei zeigte sich, dass diese drei unabhängigen Familien angehören, die keinerlei Sequenzhomologie zeigen: den Cyclophilinen, den FK506-Bindungsproteinen und den Parvulinen. Die Vertreter dieser drei Familien kommen ubiquitär sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten vor.

1.4.3. Die Cyclophilin-Familie

Erst fünf Jahre nach Entdeckung der PPI durch Fischer *et al.* (1984) erbrachte ein Sequenzvergleich, dass diese mit dem ebenfalls 1984 unabhängig davon entdeckten Cyclophilin A (CypA) (Handschumacher *et al.* 1984), dem Hauptbindungsprotein für das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA), identisch ist (Fischer *et al.* 1989). In den folgenden Jahren wurden Dutzende weitere CsA-bindende PPIasen gefunden, die hohe Sequenzhomologien in einem ca. 130 Aminosäuren langen Kernbereich und eine ebenfalls hochkonservierte dreidimensionale Struktur aus einem meist achtsträngigen β -Faltblatt und zwei α -Helices besitzen. Sie werden in der Cyclophilin-Familie zusammengefasst. Zur Unterscheidung enthält der systematische Name der Cyclophiline häufig das Molekulargewicht in kDa sowie die zelluläre Lokalisation, z.B. hCyp18cy für das menschliche (*humane*) 17,7 kDa schwere cytosolische Cyclophilin A.

1.4.4. Die FKBP-Familie

Im Jahre 1989 wurde eine zweite Klasse von PPIasen entdeckt, die an die ebenfalls immunsuppressiven Makrolide FK506 und Rapamycin binden (Harding *et al.* 1989; Siekierka *et al.* 1989). Aufgrund dieser Bindungseigenschaften wird diese Klasse von Isomerasen als FKBP („FK506 binding protein“)-Familie bezeichnet.

Anfangs wurden von dieser Familie vorwiegend Eindomänenproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 12 kDa identifiziert. Mit dieser Größe zählen sie zu den kleinsten Enzymen überhaupt und zeichnen sich durch hohe Sequenzhomologien aus. Insbesondere hydrophobe und aromatische Reste im Bereich des aktiven Zentrums sind hochkonserviert. Im Gegensatz zu den Cyclophilinen besitzen die FKBP eine ausgeprägte Substratspezifität be-

³ der besseren Lesbarkeit wegen wird der Ausdruck „prolinlimitierte Faltung“ für Faltungsreaktionen verwendet, die die Isomerisierung einer Xaa-Prolylpeptidbindung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt enthalten.

züglich der Aminosäure vor Prolin (Harrison & Stein 1990; Zoldak *et al.* 2009). Die Nomenklatur folgt bei den FKBP's dem gleichen Prinzip wie bei der Cyclophilin-Familie (z.B. *hFKBP12cy*).

Schon kurz nach der Entdeckung der FKBP's wurden die Strukturen der beiden FKBP12 aus Mensch und Rind aufgeklärt (Michnick *et al.* 1991; Moore *et al.* 1991; Van Duyne *et al.* 1991; Wilson *et al.* 1995): Dominiert wird diese Struktur von fünf antiparallelen β -Faltblattsträngen, einer kurzen α -Helix und einer langen Schleife, dem so genannten *flap* (Abb. 3-29 links).

Später wurden zahlreiche deutlich größere Proteine identifiziert, die neben anderen Domänen auch eine FKBP-Domäne enthalten. Während der Untersuchungen zu dieser Arbeit (1998-2002) standen Strukturdaten zu diesen Mehrdomänenproteinen allerdings noch nicht zur Verfügung, so dass sich sämtliche Strukturannahmen nur an den bekannten FKBP12-Strukturen orientieren konnten, welche keine Rückschlüsse auf die weiteren Domänen zuließen.

Obwohl Cyclophiline und FKBP's Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerisierungen katalysieren und durch Bindung von Immunsuppressiva reversibel in ihrer Aktivität inhibiert werden, herrschen keinerlei Sequenz- oder Strukturhomologien zwischen beiden Gruppen. Die ursprüngliche Annahme, die immunsuppressive Wirkung von CsA und FK506 werde allein durch die Inhibition der Isomeraseaktivität von *hCyp18cy* und *hFKBP12cy* verursacht, ließ sich nicht bestätigen (Bierer *et al.* 1990; Sigal *et al.* 1991). Vielmehr ist die Ca^{2+} - und Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin (CaN) Angriffsobjekt der Komplexe Cyp18cy/CsA bzw. FKBP12cy/FK506. Die Phosphatase CaN wird durch Ausbildung eines ternären Komplexes spezifisch inhibiert (Liu *et al.* 1991). Der für die Interleukin-2-Expression essentielle Transkriptionsfaktor NF-AT kann somit nicht mehr durch CaN dephosphoryliert werden und verbleibt daher inaktiv im Cytosol. Die durch Antigenkontakt am T-Zellrezeptor ausgelöste Reaktionskaskade, welche zur Produktion von Interleukin-2 führen soll, wird somit durch die Gegenwart von Cyp18cy/CsA bzw. FKBP12cy/FK506 unterbrochen und eine Immunreaktion findet nicht statt (Schreiber *et al.* 1994).

1.4.5. Die Parvuline

Ein Jahrzehnt nach der Entdeckung der ersten Peptidyl-Prolyl-Isomerase fanden Rahfeld und Mitarbeiter in *E. coli* ein nur 10 kDa großes Protein mit Peptidyl-Prolyl-Isomeraseaktivität, das sie Parvulin (lat. *parvulus* = klein) nannten (Rahfeld *et al.* 1994a). Da das Parvulin nicht durch Immunsuppressiva gehemmt wird und keinerlei Sequenzhomologien zu Cyclophilinen oder FKBP's zeigt, wurde das Parvulin als Vertreter einer eigenen Isomerasefamilie - der Parvuline - eingestuft (Rahfeld *et al.* 1994b). Ähnlich wie bei den Mitgliedern der FKBP-Familie kommen Parvulindomänen häufig als Bestandteile von Mehrdomänenproteinen vor (Hani *et al.* 1995; Lu *et al.* 1996; Rouviere & Gross 1996). Das wohl bekannteste Protein aus

dieser Gruppe ist das humane Pin1 (Lu *et al.* 1996). Dieses isomerisiert nur Phosphoserin- und Phosphothreonin-Prolylbindungen (Lu *et al.* 1999) und ist an der Regulation des Zellzyklus und zahlreichen weiteren Prozessen beteiligt. Daher ist die Rolle von Pin1 im Zusammenhang mit der Erforschung und möglicherweise Therapie zahlreicher Erkrankungen wie Tumoren oder auch Morbus Alzheimer im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses (Yaffe *et al.* 1997; Shen *et al.* 1998; Miyashita *et al.* 2003; Akiyama *et al.* 2005).

1.4.6. Der Trigger-Faktor

Der Trigger-Faktor ist ein lösliches cytosolisches Protein der Masse 48 kDa, das in allen Eubakterien vorkommt. Ursprünglich entdeckt wurde er 1987 in der Arbeitsgruppe von Wickner als Komponente des Exportsystems für sekretorische Proteine in *Escherichia coli*. Man fand, dass der Trigger-Faktor mit der exportkompetenten Form des Präproteins proOmpA sowie mit der großen Ribosomenuntereinheit wechselwirkt und vermutete daher, dass der Trigger-Faktor sekretorische Proteine in einer exportkompetenten Form hält und so deren Translokation ins Periplasma fördert (Crooke & Wickner 1987; Crooke *et al.* 1988; Lill *et al.* 1988).

Jahre später wurde der Trigger-Faktor von der Arbeitsgruppe um Fischer als ribosomenassoziierte Prolylisomerase wiederentdeckt, die in ihrer Isomeraseaktivität gegenüber Peptidsubstraten den Enzymen der FKBP-Familie gleicht, jedoch nicht durch übliche Konzentrationen von FK506 inhibierbar ist (Stoller *et al.* 1995). Nahezu gleichzeitig wurde der Trigger-Faktor auch von zwei weiteren Arbeitsgruppen wiederentdeckt, die in Quervernetzungsexperimenten fanden, dass der Trigger-Faktor mit naszierenden Proteinketten wechselwirkt (Valent *et al.* 1995; Hesterkamp *et al.* 1996). Die bereits in anfänglichen Experimenten (Stoller *et al.* 1995) entdeckte hohe Effizienz des Trigger-Faktors bei der Katalyse prolinlimitierter Proteinfaltung legte die Vermutung nahe, dass die Isomeraseaktivität des Trigger-Faktors bei der Proteinfaltung eine wichtige Rolle spielt.

Im Gegensatz zu den kleinen Isomerasen Cyclophilin A, FKBP12 und Parvulin, die die Prolylisomerisierung an kleinen Peptiden besser katalysieren als an faltenden Proteinen (Schmid 1993; Stein 1993; Fischer 1994), ist die katalytische Effizienz des Trigger-Faktors gegenüber faltenden Enzymen vielfach höher als gegenüber Oligopeptiden. Die Ursache für diese hohe katalytische Effizienz liegt in der starken Wechselwirkung des Trigger-Faktors mit seinem Proteinsubstrat während der Katalyse und spiegelt sich in einer niedrigen Michaeliskonstanten K_M wider, die im Bereich von 1 μM liegt. Die Substrataffinität der bis dahin bekannten kleinen Prolylisomerasen ist deutlich geringer (Scholz *et al.* 1997b).

Partieller proteolytischer Abbau zeigte, dass Trigger-Faktor einen modularen Aufbau aus (mindestens) drei Domänen besitzt (Zarnt *et al.* 1997). Die aminoterminal Domäne (N) bindet an das Ribosom (Hesterkamp *et al.* 1997), die mittlere Domäne (M) bildet die eigentliche Isomerase (Hesterkamp & Bukau 1996; Stoller *et al.* 1996). Die Rolle der carboxiterminalen Do-

mäne (C) war während der Forschung zu dieser Arbeit noch unbekannt. Größere Klarheit dazu konnte erst die später aufgeklärte Struktur des Trigger-Faktors liefern (Ferbitz *et al.* 2004).

Sequenzanalysen zeigten schwache Homologien zwischen der M-Domäne des Trigger-Faktors und der Familie der FKBP's (Callebaut & Mornon 1995) und auch das Fern-UV-CD-Spektrum der isolierten M-Domäne gleicht dem von *hFKBP12* (Zarnt *et al.* 1997). Aus diesen Gründen wird die mittlere Domäne auch als FKBP-Domäne bezeichnet und Trigger-Faktor seitdem der FKBP-Familie zugerechnet. Die aus dem intakten Trigger-Faktor durch Subtilisin ausgeschnittene FKBP-Domäne zeigt gegenüber kurzen Peptiden die gleiche Prolylisomerase-aktivität wie der komplette Trigger-Faktor (Hesterkamp & Bukau 1996; Stoller *et al.* 1996). Dagegen geht die hohe Aktivität bei der Katalyse prolinlimitierter Proteinfaltungsreaktionen durch Entfernen der äußeren Domänen fast vollständig verloren (Scholz *et al.* 1997b; Zarnt *et al.* 1997). Diese Befunde ließen vermuten, dass die für die hochaffine Substratbindung verantwortliche Stelle und das katalytisch aktive Zentrum auf verschiedenen Domänen des Trigger-Faktors lokalisiert sind.

Unterstützung fand diese Vermutung durch Studien zur Inhibierbarkeit der Prolylisomeraseaktivität der Trigger-Faktoren aus *E. coli* und *Mycoplasma genitalium*. Es zeigte sich, dass die Katalyse der prolinlimitierten Faltung einer reduzierten und carboxymethylierten Variante von Ribonuklease T1 (RCM-T1; s. 1.5.) durch dauerhaft entfaltete Proteine wie reduziertes und carboxymethyliertes α -Lactalbumin aus Rind (RCM-La) kompetitiv inhibiert wird, während die Gegenwart von RCM-La auf die Katalyse der Prolylisomerisierung in kurzen Oligopeptiden keine Wirkung zeigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Erkennung eines Proteinsubstrats durch den Trigger-Faktor nicht von der Anwesenheit eines Prolinrests abhängt (Scholz *et al.* 1998). All diese Befunde stützen die These von der räumlichen Trennung von Bindungs- und Katalyseort.

Diese chaperonartigen Bindungseigenschaften, die Lokalisation am Ribosom, die Assoziation mit naszierenden Proteinketten sowie die erstmalige Isolierung im Zusammenhang mit dem Proteinexport ließen seit den späten 1990er Jahren vermuten, dass der Trigger-Faktor neben seiner rein faltungskatalytischen Funktion in der prokaryontischen Zelle auch allgemeine Chaperonaufgaben übernehmen könnte (Rassow & Pfanner 1996; Scholz *et al.* 1997b).

1.5. RNase T1 als Modellsystem für prolinlimitierte Proteinfaltung

Das von Fischer und Mitarbeitern entwickelte PPIase-Testsystem, das die isomerspezifische Proteolyse eines chromogenen Oligopeptids durch Chymotrypsin nutzt (Fischer *et al.* 1984), hat bei der Erforschung der Katalyse der Proteinfaltung durch PPIasen zwei gravierende Schwächen: Zum einen kann die Hilfsprotease (Chymotrypsin) auch die zu untersuchende PPIase spalten und somit deaktivieren, zum anderen kann ein kurzes Testpeptid die Bindungseigenschaften eines großen entfalteten Substratproteins oft nur unzureichend imitieren. Diese beiden Nachteile können vermieden werden, wenn man für PPIase-Aktivitätstests eine spezielle modifizierte Variante der Ribonuklease T1 (RNase T1) verwendet.

RNase T1 wird vom Schimmelpilz *Aspergillus oryzae* sezerniert und besteht aus 104 Aminosäuren. Ihr einziges Tryptophan (Position 59) ist im gefalteten Protein lösungsmittelunzugänglich, so dass sich die Fluoreszenz dieses Tryptophans und somit des gesamten Proteins im gefalteten und entfalteten Zustand stark unterscheidet. Daher kann der Faltungszustand der RNase T1 durch einfache Fluoreszenzmessung verfolgt werden.

Die Struktur der RNase T1 (**Abb. 1-2**) wurde sowohl im Kristall als auch in Lösung ermittelt (Heinemann & Saenger 1982; Hoffmann & Rüterjans 1988; Martinez-Oyanedel *et al.* 1991). Zwei Disulfidbrücken (Cys2-Cys10 und Cys6-Cys103) tragen zur Stabilität des nativen Proteins bei (Pace *et al.* 1988). Durch Reduktion und Carboxymethylierung dieser Disulfidbrücken (RCM-Form) wird die RNase T1 so stark destabilisiert, dass sie unter Standardbedin-

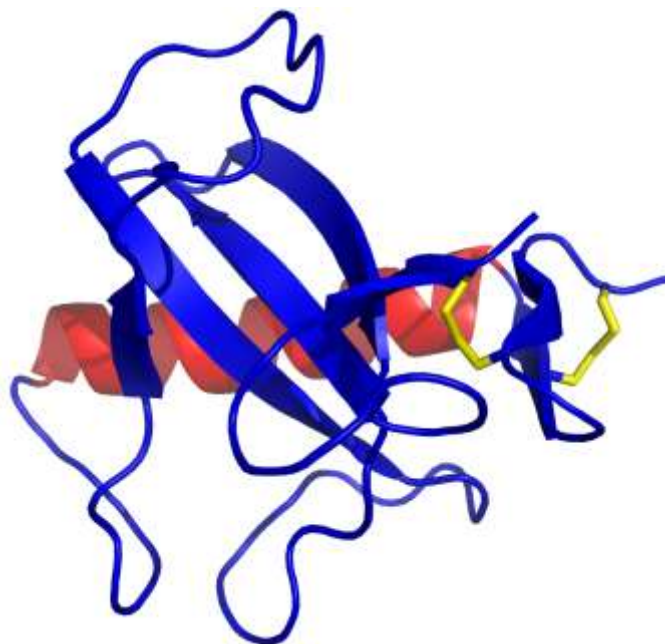


Abb. 1-2: Dreidimensionale Struktur von RNase T1 im Bänderdiagramm. Die beiden Disulfidbrücken zwischen Cys2 & Cys10 und zwischen Cys6 & Cys103 sind gelb eingezeichnet. Die Strukturdarstellungen wurden mit dem Programm PyMol (DeLano 2003) unter Verwendung der Daten der PDB-Strukturdatei 9RNT (Martinez-Oyanedel *et al.* 1991) erstellt.

gungen (pH 8,0, 15°C) vollständig denaturiert vorliegt. Allerdings kann RNase T1 durch Zugabe von Kochsalz stabilisiert werden (Pace & Grimsley 1988), so dass auch das Protein ohne intakte Disulfidbrücken bei Kochsalzkonzentrationen über 2 M eine nativ-ähnliche, enzymatisch schwach aktive Struktur annimmt (Pace *et al.* 1988).

Weiterhin besitzt RNase T1 vier Proline, von denen zwei (Pro39 und Pro55) im nativen Enzym in *cis*-Stellung vorliegen. Da im entfalteten Zustand das Gleichgewicht zwischen *cis*- und *trans*-Peptidyl-Prolyl-Bindungen zu ca. 80 % auf der Seite der *trans*-Bindungen liegt (vgl. 1.4.1.), besitzen rechnerisch nur etwa 4 % der langzeitentfalteten RNase T1-Moleküle die native Konformation sowohl bei Pro39 als auch bei Pro55.

Der kinetische Mechanismus der Ent- und Rückfaltung von RNase T1 wurde eingehend untersucht (Kiefhaber *et al.* 1990b; Kiefhaber *et al.* 1990c; Kiefhaber *et al.* 1992; Mayr & Schmid 1993a). Erwartungsgemäß werden Entfaltung und Rückfaltung stark durch die Isomerisierungsreaktionen der beiden *cis*-Proline Pro39 und Pro55 bestimmt. Daraus resultieren sehr komplexe Faltungskinetiken. Daher wurde eine RNase T1-Variante konstruiert, bei der die Aminosäuren Ser54-Pro55 durch die Sequenz Gly54-Asn55 ersetzt sind. Dieser Austausch ändert die Proteinstabilität nur geringfügig (Kiefhaber *et al.* 1990a), vereinfacht aber deutlich den Faltungsmechanismus. Das Faltungsverhalten der reduzierten und carboxymethylierten Form dieser Mutante (künftig mit RCM-T1 bezeichnet) wurde ebenso eingehend untersucht (Mücke & Schmid 1994a; Mücke & Schmid 1994b). Der Vorteil dieser Variante ist, dass Ent- und Rückfaltung von RCM-T1 allein durch Variation der NaCl-Konzentration induziert werden können und ohne Ausbildung beobachtbarer Intermediate verlaufen. Der Faltungsmechanismus entspricht einem einfachen Drei-Spezies-Modell (**Schema 1-1**).



Schema 1-1: Drei-Spezies-Modell für die Faltung von RCM-T1. N^* ist die gefaltete Form des Proteins, U^{39c} und U^{39t} sind die entfalteten Formen mit der Prolyl-Peptidbindung zwischen Tyr38 und Pro39 in der *cis*- bzw. *trans*-Konformation.

Da der langsame Schritt der *cis-trans*-Isomerisierung bei Prolin39 kinetisch mit der schnelleren (Ent-)Faltungsreaktion koppelt und der schnellere Schritt mit einer starken Fluoreszenzänderung verbunden ist, eignet sich dieses System hervorragend, um die katalytische Aktivität von PPIasen zu bestimmen.

1.6. Problemstellung

Beim Trigger-Faktor konnte erstmals gezeigt werden, dass eine aus mehreren Domänen aufgebaute PPIase die prolinlimitierte Rückfaltung entfalteter Proteine besser katalysieren kann als die kleinen Eindomänenenzyme wie FKBP12 oder CypA. Als Hauptursache für diese höhere Effizienz wurde eine erhöhte Substrataffinität des Trigger-Faktors identifiziert (Scholz *et al.* 1997b). Eine genetische Deletion des Trigger-Faktors führt nur zu geringen Wachstumsdefekten (Göthel *et al.* 1998). Parallel zu dieser Arbeit konnten aber zwei Gruppen zeigen, dass die gleichzeitige Deletion der Gene für Trigger-Faktor und DnaK für *E. coli* unter den meisten Wachstumsbedingungen letal ist (Deuerling *et al.* 1999; Teter *et al.* 1999). Die Autoren schlugen daher stark überlappende Funktionen für diese beiden Faltungshelfer vor.

DnaK besitzt hauptsächlich eine „Haltefunktion“. Erst nach Verbrauch von Energieäquivalenten (ATP) und unter Beteiligung der Cochaperone DnaJ und GrpE wird das gebundene Proteinsubstrat wieder freigesetzt. Eine derart statische Haltefunktion von Trigger-Faktor wäre für eine effiziente Katalyse prolinlimitierter Faltungsreaktionen kontraproduktiv. Neben einer guten Substratbindung ist es auch wichtig, dass das Substratprotein unmittelbar nach der Prolylisomerisierung den Trigger-Faktor rasch wieder verlassen und sich schnell in seinen nativen Zustand falten kann (Schmid 1993). Für eine optimale Katalyse prolinlimitierter *de-novo*-Faltung sollten also Bindung an und Abdissoziation vom Trigger-Faktor sehr schnelle Prozesse sein (Scholz *et al.* 1998), damit keine Blockierung der Faltung durch Bindung eintreten kann, so wie dies bei einigen Chaperonen beobachtet wurde (Goloubinoff *et al.* 1989; Buchberger *et al.* 1996).

Aufbauend auf meiner Diplomarbeit sollten daher im Rahmen dieser Arbeit die kinetischen Eigenschaften des Trigger-Faktors bezüglich der Wechselwirkung mit Proteinsubstraten untersucht werden. Die vorliegende Arbeit zeigt nun, dass die Wechselwirkung des Trigger-Faktors mit entfaltenen Proteinketten ein dynamischer Prozess mit Komplexlebenszeiten im Millisekundenbereich ist, also in dem Zeitbereich, der für die ribosomale Synthese nur weniger Peptidbindungen benötigt wird.

Zudem sollte Trigger-Faktor auf weitere chaperontypische Eigenschaften untersucht werden, wie die Verhinderung der Aggregation entfalteter Proteine, die Entfaltung labiler Proteine durch präferentielle Bindung des entfaltenen Zustands, mögliche Faltungsverzögerungen durch Bindung und außerdem, welche Sequenzmotive bevorzugt gebunden werden.

Noch wenig war zu Beginn dieser Arbeit über die Ribosomenbindungseigenschaften des Trigger-Faktors bekannt. Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Varianten sollte in dieser Arbeit die Bindungsaffinität des Trigger-Faktors für das Ribosom sowie die Dynamik dieser Bindung untersucht werden. Die hier ermittelte Komplexlebensdauer von mehreren Sekunden gewährleistet, dass der Trigger-Faktor während der gesamten Synthesedauer eines Proteins am Ribo-

som gebunden bleibt und während dieser Bindungszeit die neu entstehende Proteinkette dynamisch nach zu isomerisierenden Prolylbindungen „abtasten“ kann.

In den ausgehenden 1990er Jahren wurde eine wachsende Zahl von Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen identifiziert, die wie Trigger-Faktor aus mehreren Domänen (modular) aufgebaut sind. Die Charakterisierung derartiger PPIasen stellte das zweite Hauptziel dieser Arbeit dar.

SlyD und FkpA aus *E.coli*, FKBP18 aus *Thermococcus sp. KS-1* und Trigger-Faktor aus *Thermotoga maritima*, sowie diverse Variationen daraus wurden von Christian Scholz (Roche Diagnostics, Penzberg) zur Verfügung gestellt. Ziel von Roche Diagnostics war es, für Zwecke der HIV-Diagnostik ein Ektodomänenfragment des HIV-1 Hüllproteins gp41 stabil in Lösung zu bringen. Dies gelang am besten als Fusionsprotein mit verschiedenen Chaperonen. Darunter fanden sich auch die beiden PPIasen SlyD und FkpA (Scholz *et al.* 2005; Scholz *et al.* 2006; Scholz *et al.* 2008). Es erschien erstaunlich, dass ausgerechnet PPIasen als Fusionspartner zum Erfolg führten. Deshalb sollten diese Isomerasen und die von ihnen abgeleiteten Fusionskonstrukte im Rahmen dieser Arbeit bezüglich ihrer Isomerasen- und Chaperoneigenschaften untersucht werden.

In Kooperation mit der Gruppe von Maximilian Tropschug (Universität Freiburg) wurden außerdem das 1999 aus dem Schimmelpilz *Neurospora crassa* isolierte FKBP22 sowie dessen isolierte Faltungsdomänen charakterisiert.

Alle bisher beschriebenen PPIasen besitzen jeweils eine Isomerasedomäne vom FKBP-Typ. Zusätzlich zu diesen sollte auch noch SurA aus dem Periplasma von *E.coli* enzymatisch charakterisiert werden. Dieses besitzt unter anderem zwei Domänen vom Parvulin-Typ. Susanne Behrens und Carol A. Gross (UC San Francisco, USA) wollten herausfinden, welche Proteinregionen und Aktivitäten von SurA für seine Funktion *in vivo* am bedeutendsten sind. Besonderes Augenmerk sollte auf die Frage gelegt werden, ob die Prolylisomeraseaktivität des Enzyms dabei eine entscheidende Rolle spielt. Bei den bisherigen Isomerasemessungen im chymotrypsingekoppelten Peptidtest hatte sich gezeigt, dass SurA und seine verschiedenen Teilkonstrukte sehr schnell von Chymotrypsin abgebaut wurden (S. Behrens, persönliche Mitteilung). Daher entstand eine Kooperation, um die Prolylisomeraseaktivitäten der diversen SurA-Konstrukte im Rahmen dieser Arbeit im proteasefreien RCM-T1-Rückfaltungstest zu ermitteln.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Bakterienstämme

Für die Expression von Proteinen oder die Gewinnung von Ribosomen wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

<i>E. coli</i> DH5 α	<i>endA1</i> , <i>F</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$), <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , <i>recA1</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>deoR</i> , <i>thi-1</i> , ϕ 80d, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169	(Woodcock <i>et al.</i> 1989)
<i>E. coli</i> XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>supE44 relA1 lac</i> [<i>F proAB lacI^q Z</i> Δ <i>M15 Tn10</i> (Tet ^R)]	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> M15	Nal ^S Str ^S Rif ^S <i>lac^- ara^- gal^- mtl^- F^- recA^+ uvr^+ lon^+</i>	(Zamenhof & Villarejo 1972; Qiagen 1997)
<i>E. coli</i> JC7623 Δ <i>tig</i>	<i>F thi-1 his-4 proA2 argE3 thr-1 leuB6 ara-14 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 supE44 tsx-33 rpsL1 recB21 recC22 sbcB15 sbcC201</i>	(Lloyd & Buckman 1985; Teter <i>et al.</i> 1999)

Der Stamm *E. coli* JC7623 Δ *tig* wurde mir freundlicherweise von Jens-Ulrich Rahfeld, Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft in Halle/Saale zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Plasmide

In dieser Arbeit wurden die folgenden Plasmide verwendet:

pREP4	Km ^r , <i>lacI^q</i>	(Qiagen 1997)
pA2T1(P55)	Amp ^r , Expressionsvektor für RNase T1 (S54G, P55N), <i>lacI^q</i> , <i>lacPO</i> , <i>lppP</i> , <i>ompA</i> Signalsequenz für Transport ins Periplasma	(Kiefhaber <i>et al.</i> 1990a)
pTFMG	Amp ^r , Expressionsvektor für <i>M. genitalium</i> Trigger-Faktor, basierend auf pQE30 (Qiagen, Hilden)	(Bang <i>et al.</i> 2000)
pQETF	Amp ^r , Expressionsvektor für <i>E. coli</i> Trigger-Faktor, basierend auf pQE60 (Qiagen, Hilden)	T. Tradler, Halle, nicht publiziert
pQETF(R14C)	wie pQETF, Expressionsvektor für <i>E. coli</i> Trigger-Faktor (R14C)	diese Arbeit
pQETF(S30C)	wie pQETF, Expressionsvektor für <i>E. coli</i> Trigger-Faktor (S30C)	diese Arbeit
pQETF(3A)	wie pQETF, Expressionsvektor für <i>E. coli</i> Trigger-Faktor (F44A, R45A, K46A)	diese Arbeit
pQETF(R14C,3A)	wie pQETF, Expressionsvektor für <i>E. coli</i> Trigger-Faktor (R14C, F44A, R45A, K46A)	diese Arbeit
pQETF(S30C,3A)	wie pQETF, Expressionsvektor für <i>E. coli</i> Trigger-Faktor (S30C, F44A, R45A, K46A)	diese Arbeit
pQETF(W151F)	wie pQETF, Expressionsvektor für <i>E. coli</i> Trigger-Faktor (W151F)	(Maier 1998)

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde mir das Plasmid pQETF von Thomas Tradler, Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft in Halle/Saale und das Plasmid pTFMG von Holger Bang, Universität Erlangen.

2.1.3. Oligodesoxyribonukleotide

Die folgenden Oligodesoxyribonukleotide wurden in dieser Arbeit für Sequenzierung, PCR und Mutagenese verwendet. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Sequenz in 5'→3'-Richtung (von der Wildtypsequenz abweichende Basen sind unterstrichen)
70-89	Sequenzierung von pQETF-Plasmiden, (+)-Strang	CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG
330-313	Sequenzierung von pQETF-Plasmiden, (-)-Strang	GCT CAT CAG GTC ACC CAG
tfsequenz	Sequenzierung von pQETF-Plasmiden, (+)-Strang	GTT GAA GTG ACC GAC GCT G
R14Csense	Mutagenese Mismatchprimer für Austausch R14C, (+)-Strang	GGC CTT GGC CGC <u>T</u> GT GTA ACG ATT AC
R14Cantisense	Mutagenese Mismatchprimer für Austausch R14C, (-)-Strang	GTA ATC GTT ACA <u>C</u> AG CGG CCA AGG CC
S30Csense	Mutagenese Mismatchprimer für Austausch S30C, (+)-Strang	CCG CTG TTA AAT <u>G</u> CG AGC TGG TC
S30Cantisense	Mutagenese Mismatchprimer für Austausch S30C, (-)-Strang	GAC CAG CTC GCA <u>T</u> TT AAC AGC GG
3xAsense	Mutagenese Mismatchprimer für Austausch F44A, R45A, K46A, (+)-Strang	GTA CGT ATT GAC GGC <u>G</u> CC <u>G</u> CC <u>G</u> CA GGC AAA GTG CCA ATG
3xAantisense	Mutagenese Mismatchprimer für Austausch F44A, R45A, K46A, (-)-Strang	CAT TGG CAC TTT GCC <u>T</u> GC <u>G</u> GC <u>G</u> GC GCC GTC AAT ACG TAC
R145STOPsense	Mutagenese Mismatchprimer zur Einführung eines Stop-Codons, (+)-Strang	GCT GGA TAC TCT <u>G</u> TA <u>A</u> AA ACA GCA GGC G
R145STOPantis	Mutagenese Mismatchprimer zur Einführung eines Stop-Codons, (-)-Strang	CGC CTG CTG TTT <u>T</u> TA CAG AGT ATC CAG C

2.1.4. Nährmedien

LB-Medium:	10 g/l Trypton bzw. Bacto-Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
dYT-Medium:	16 g/l Trypton bzw. Bacto-Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
Nährböden:	dYT-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar

Die Medien wurden 20 min bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert und nach Erkalten unter 50°C mit den gewünschten Antibiotika versetzt. Dazu wurden sterilfiltrierte 1.000-fach konzentrierte Stammlösungen verwendet. Die Endkonzentrationen betrugen 300 µg/ml bei Ampicillin (Amp), 50 µg/ml bei Kanamycin (Km) und 25 µg/ml Chloramphenicol (Cm).

2.1.5. Enzyme, Proteine und Peptide

C. Scholz (Roche, Penzberg)	Trigger-Faktor aus <i>Thermotoga maritima</i> , sämtliche Varianten von SlyD, FkpA, TcFKBP18
S. Behrens (UC San Francisco, USA)	sämtliche Varianten von SurA
M. Tropschug (Universität Freiburg)	sämtliche Varianten von NcFKBP22
V. Sieber (Universität Bayreuth)	RNase T1(4X)
E. Deuerling (Universität Freiburg)	His ₆ -Trigger-Faktor, His ₆ -Trigger-Faktor FRK/AAA
M. Schutkowski (Max-Planck-Forschungsstelle Halle/Saale)	Testpeptid Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA, Lactalbumin-Peptidbibliothek
G. Stoller (Max-Planck-Forschungsstelle Halle/Saale)	polyklonales Trigger-Faktor-Antiserum aus Kaninchen
Sigma (Deisenhofen)	α -Lactalbumin Typ III, Lysozym aus Hühnereiweiß, Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase-Konjugat aus Ziege,
Promega (Mannheim)	Taq- und Pfu-DNA-Polymerase
New England Biolabs (Frankfurt/Main)	Restriktionsendonukleasen
Promega (Mannheim)	Restriktionsendonukleasen
MBI Fermentas (Vilnius, LT)	Restriktionsendonukleasen, 10 x Rinderserumalbumin (BSA, 1 mg/ml)
Qiagen (Hilden)	Ribonuklease A (RNase A, 70 U/mg)
New England Biolabs (Frankfurt/Main)	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)
Roche Diagnostics (Mannheim)	Citratsynthase aus Schweineherz, Rinderserumalbumin (BSA), Chymotrypsin aus Rinderpankreas

2.1.6. Chemikalien

Eurobio (Les Ullis, F)	Resophor High Resolution Agarose, Ethidiumbromid
Fluka (Neu-Ulm)	Dithioerythrol (DTE) p.A., Dithiothreitol (DTT) p.A.
Gerbu (Gaiberg)	Ampicillin , IPTG, Kanamycin
ICN (Cleveland, USA)	Guanidin-Hydrochlorid ultrapure
Linde (München)	Stickstoff flüssig, Stickstoff gasförmig
Merck (Darmstadt)	Aceton, Acrylamid, Agar-Agar, Ammoniumacetat, Ammoniumsulfat p.A., Borsäure p.A., 2-Butanol, Calcium- chlorid, D-Glucose-Monohydrat, Essigsäure, Essigsäure p.A., Ethanol p.A., N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat- Dinatriumsalz-Dihydrat p.A., Glycerin p.A., Glycin p.A., Hefeextrakt, Kaliumacetat, Kaliumchlorid p.A., Kaliumdi- hydrogenphosphat p.A., di-Kaliumhydrogenphosphat

Merck (Darmstadt; Fortsetzung)	Kaliumjodid p.A., Magnesiumchlorid-Hexahydrat p.A., β -Mercaptoethanol, Methanol p.A., Natriumacetat-Trihydrat p.A., Natriumcarbonat p.A., Natriumchlorid p.A., Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat p.A., <i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, Natriumhydroxid p.A., Natriumjodacetat, Pepton aus Casein, PVDF Blottingmembran, konz. Salzsäure p.A., Trichloressigsäure p.A.
MBI Fermentas (Vilnius, LT)	Restriktionspuffer „Gelb“; 10 x Triton X 100 (1,5 % (w/v))
MoBiTec (Göttingen)	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid (TCEP)
Molecular Probes (Eugene, USA)	Acrylodan, BADAN
New England Biolabs (Frafurt/Main)	Desoxyribonukleotide (dNTP, je 10 mM)
Roche Diagnostics (Mannheim)	Complete Proteaseinhibitor Tabletten
Roth (Karlsruhe)	Desoxyribonukleotide (dNTP), Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid + N,N'-Methylen-bis-Acrylamid), Roti-Load-Proteinauftragspuffer, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan p.A.
Serva (Heidelberg)	Ammoniumperoxodisulfat p.A., Bromphenolblau, Natriumdodecylsulfat (SDS), N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Xylencyanol
Sigma (Deisenhofen)	N-Acetyl-L-Tryptophanamid, N-Acetyl-L-Tyrosinamid, Ammoniumhydrogencarbonat p.A., Antifoam A, Chloramphenicol, Coomassie Brilliant Blue G, HEPES, 5-((((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure (1,5-IAEDANS, > 90%), Iodacetat (99 %), MES, Nickelsulfat-Hexahydrat, Natriumcitrat

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt, D) im Reinheitsgrad p.A. bezogen. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde mit einer Seralpur-Reinstwasseranlage deionisiert (ddH₂O, Leitfähigkeit < 0,1 μ S/cm). Puffer für spektroskopische Messungen wurden durch 0,45 μ m-Nylonfilter filtriert und vor Gebrauch jeweils mindestens 20 min bei 4 kPa entgast.

Die exakte GdmCl- und NaCl- Konzentration von Puffern und Proteinlösungen wurde refraktometrisch anhand der Gleichungen 2-1 (Pace 1986) und 2-2 (Mücke & Schmid 1994c) bestimmt.

$$[\text{GdmCl}] = 57,147 \cdot \Delta n + 38,68 \cdot \Delta n^2 + 91,6 \cdot \Delta n^3 \quad (2-1)$$

$$[\text{NaCl}] = 105,74 \cdot \Delta n + 89,37 \cdot \Delta n^2 + 7259 \cdot \Delta n^3 \quad (2-2)$$

[GdmCl]: GdmCl- Konzentration der Probe in M

[NaCl]: NaCl- Konzentration der Probe in M

Δn : Differenz der Brechungsindizes der GdmCl-/NaCl-haltigen Probe und des GdmCl-/NaCl-freien Puffers

2.1.7. Geräte

Amicon (Danvers, USA)	8200 Ultrafiltrationszelle
Applied Photophysics (Leatherhead, UK)	DX 17 MV Sequential Stopped-flow Fluorimeter
Bachofer (Reutlingen)	UV-Transilluminator 302 nm
Beckmann (Glenrothes, UK)	Microfuge E Tischzentrifuge
Biometra (Göttingen)	Fast Blot B32 System
Christ (Osterode)	Alpha 1-4 Gefriertrocknungsanlage
Du Pont (Bad Homburg)	Sorvall GS-3-, SS-34- und T-865-Rotoren und Zentrifugenbecher Sorvall OTD 65 B Ultrazentrifuge, Sorvall RC 5 B Plus Zentrifuge
Eppendorf (Hamburg)	Thermoschüttler „Thermomixer 5436“
Haake (Karlsruhe)	Thermostate CH und K
Hellma (Müllheim)	Präzisionsküvetten aus opt. Spezialglas und aus Quarzglas
Heraeus (Nürnberg)	Labofuge 400 R
Hewlett Packard (Waldbronn)	8652-Diodenarray Photometer
Hitachi (Tokio, Japan)	Fluoreszenzspektrophotometer F-4010, Fluoreszenzspektrophotometer F-4500
Jasco (Groß-Umstadt)	J-600A Spektropolarimeter mit PTC-348WI Peltierelement
Kontron (Echig)	Uvikon 860 Zweistrahlphotometer
Krüss (Hamburg)	Refraktometer
LTF Labortechnik (Wasserburg)	Bio-Print Darkroom CN-UV / WL
Microfluidics (Newton, USA)	Microfluidizer M-110L
Micromass (Manchester, UK)	LCT ESI-TOF Massenspektrometer
MJ Research (Watertown, USA)	Minicycler PTC-150 HB
Pharmacia (Freiburg)	FPLC-Anlage mit Steuergerät Liquid Chromatography Control- ler LCC-500, Pumpe P-1, 2 x Pumpe P-500, Motor-Ventil MV- 7, UV-Detektor UV-M, Zweikanalrekorder und Fraktionssamm- ler FRAC-100, Chromatographiesäulen: XK 50/30 gepackt mit DEAE-Fractogel EMD-650 M (Merck, Darmstadt) Gelbett 50 mm x 7,5 cm, V \approx 150 ml), XK 26/20 gepackt mit Ni-NTA Sepharose (Qiagen, Hilden, Gelbett 26 mm x 5 cm, V \approx 26 ml), HiLoad Superdex 75 (26/60) prep grade-Gelfiltrationssäule 2050 Midget Vertikalelektrophoresekammer
PeqLab (Erlangen)	Easyject Prima Elektroporator
Sartorius (Göttingen)	Laboratory L610D Waage, Research R200D Analysenwaage
Seral (Ransbach-Baumbach)	Seralpur Pro 90 CN Reinstwasseranlage
WTW (Weilheim)	pH 537 Microprocessor pH-Meter

2.1.8. Verbrauchsmaterialien und Kits

FisherScientific (Schwerte)	Membranfilter (0,22 µm und 0,45 µm)
Pharmacia (Uppsala, SWE)	FlexiPrep Kit, NAP-10-Säulen (Sephadex G-25 DNA Grade)
Qiagen (Hilden)	Ni-NTA-Superflow-Agarose
Spectrum (Los Angeles, USA)	Spectra/Por-Dialysesschläuche (Ausschlusslimit 3,5 kDa & 6-8 kDa)

2.1.9. Computerprogramme

ClustalW	Alignment	(Thompson <i>et al.</i> 1994)
Grafit 3.0	Auswertung Kinetiken, Spektren	(Erithacus Software; Staines, UK)
Kinhit 1.1	kinetische Messungen	(Andreas Wolpers)
MolMol	Strukturdarstellung	(Koradi <i>et al.</i> 1996)
PyMol	Strukturdarstellung	(DeLano 2003)

2.2. Elektrophoretische Methoden

2.2.1. Agarose Gelelektrophorese

TAE-Puffer (1x):	40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA pH ^{20°C} 8,0
Probenpuffer (6x):	30 % (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol
Färbelösung:	2 µg / ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer (0,5x)
DNA-Längenstandard:	λ- <i>Eco</i> 130I (19.329, 7.743, 6.223, 4.254, 3.472, 2.690, 1.882, 1.489, 925, 421, 74 bp)

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen. Je nach Länge der aufzutrennenden Fragmente wurde der Agarosegehalt zwischen 0,8 % und 1,6 % (w/v) in TAE-Puffer (1x) variiert. Die DNA-Proben wurden mit 1 µl Probenpuffer (6x) je 5 µl Eigenvolumen versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Gleichzeitig wurde DNA-Längenstandard mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer (0,5x) bei einer Spannung von 120 V (Feldstärke: 6 V / cm Elektrodenabstand) bis der Bromphenolblau-Marker das Ende des Gels erreichte. Nach 10 min Färben des Gels in Ethidiumbromidlösung und kurzem Entfärben in TAE-Puffer (0,5x) konnten die DNA-Banden mit UV-Licht (302 nm) im Transilluminator sichtbar gemacht werden.

2.2.2. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Alle Polyacrylamid-Gelelektrophoreseexperimente wurden in einer Midget Vertikalelektrophorese-kammer durchgeführt. Das Trenngel hatte eine Größe von 80x50x0,75 mm, und das Sammelgel von 80x15x0,75 mm. Als Elektrophoresepuffer wurde das Ornsteinsche Glycin/Chlorid-System verwendet (Ornstein 1964; Laemmli 1970; Allen *et al.* 1984). Die aufgeführten Lösungen beziehen sich auf Gel-

elektrophoresen unter nativen Bedingungen. Bei denaturierenden SDS-Gelelektrophoresen enthielten Gele und Laufpuffer zusätzlich 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS).

Trenngel: 14,6 % (w/v) Acrylamid, 0,4 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,5 M Tris/HCl pH^{25°C} 8,8

Sammelgel: 4,4 % (w/v) Acrylamid, 0,12 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,17 M Tris/HCl pH^{25°C} 6,8

Die Polymerisation von Trenn- und Sammelgel wurde durch Zugabe von jeweils 0,09 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat und 0,15 % (v/v) N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin gestartet. Zuerst wurde das Trenngel gegossen, das nach Auspolymerisieren mit dem Sammelgel überschichtet wurde.

Probenpuffer (3x), nativ: 30 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Probenpuffer (3x), denat.: 30 % (v/v) Glycerin, 3 % (w/v) SDS, 80 mM DTT, 2,7 mM EDTA, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Laufpuffer: 0,19 M Glycin, 25 mM Tris

Fixierlösung: 20 % (w/v) Trichloressigsäure

Färbelösung: 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 5 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

10 µl einer geeigneten Verdünnung einer Proteinlösung (< 5 µg Protein / µl) wurden mit 5 µl Probenpuffer (3x) gemischt. Proben für denaturierende Elektrophoresen wurden 5 min in kochendem Wasser inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Pro Geltasche wurden 10 µl des Überstands aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte unter Kühlung der Kammer (ca. 7-10°C) bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA je Gel, bis der Bromphenolblaumarker das untere Gelende erreicht hatte. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel 30 min fixiert, dann 12 h gefärbt und anschließend mehrere Stunden entfärbt.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Isolierung von Plasmiden vom Typ pQETF

E. coli M15 Kulturen mit dem jeweils gewünschten Plasmid wurden über Nacht in dYT-Medium mit 300 µg/ml Ampicillin bei 37°C angezogen. 1,5 ml der Kultur wurden abzentrifugiert. Aus den so gewonnenen Zellen wurde die doppelsträngige Plasmid-DNA unter Verwendung des *FlexiPrep* Kits (Pharmacia, Freiburg) gemäß Herstellerangaben isoliert. Das Grundprinzip dieser Methode beruht darauf, dass Zellen in Gegenwart von RNase I im alkalischen Milieu (Sambrook *et al.* 1989) aufgeschlossen werden, die DNA dann an eine Anionenaustauschermatrix gebunden und nach Waschen mit ddH₂O eluiert wird.

2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.3.2.1. QuikChange-PCR Mutagenese von Plasmiden vom Typ pQETF

Ortsgerichtete Mutationen wurden in die pQETF Plasmide mit Hilfe der *QuikChange*-Reaktion (Stratagene, La Jolla, USA) eingeführt. Die PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 60 µl mit

4x50 μ M dNTPs, je 200 nM *Sense*- und *Antisense*-Mutageneseprimer und 0,2 μ l Templat-Plasmid-DNA (ca. 100 ng/ μ l) im *Pfu*-Polymerase-Puffersystem (20 mM Tris/HCl pH^{25 °C} 8,0, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA). Nach Aufheizen auf 95°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 U *Pfu*-Polymerase gestartet. Es folgten 30 PCR Zyklen mit je 30 s bei 95°C (Strangtrennung), 1 min bei 49°C (Hybridisierung) und 9 min bei 68°C (Polymerisation). Anders als bei der exponentiellen PCR wird bei dieser Art der PCR je Zyklus und Templat-Molekül nur ein Strang synthetisiert (lineare PCR). Das Produkt wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.) analysiert. Abschließend wurde die noch vorhandene Templat-DNA durch vierstündigen Restriktionsverdau mit 10 U *DpnI* bei 37°C zerstört.

Nach Entsalzen des PCR-Ansatzes durch Mikrodialyse in ddH₂O wurden *E. coli*-Zellen (meist XL1Blue) mit je 10 μ l dieses Ansatzes transformiert (2.3.3.), die Zellen auf Selektivmedium ausplattiert und resultierende Kolonien per Kolonie-PCR (2.3.2.2.) analysiert. Aus erfolgversprechenden Klonen wurden dann Plasmide isoliert (2.3.1.), sequenziert und in den Expressionsstamm (*E.coli* M15 pREP4) eingebracht.

2.3.2.2. Kolonie-PCR

Der Erfolg einer *QuikChange*-PCR Mutagenese und der anschließenden Transformation wurde mittels Kolonie-PCR überprüft. In jedem 10 μ l PCR-Ansatz befanden sich 10 mM Tris/HCl pH^{25 °C} 9,0, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 0,5 mM MgCl₂, 4x50 μ M dNTPs, je 250 nM der beiden PCR-Primer und 50 mU *Taq*-Polymerase. Zellen einer zu prüfenden Kolonie wurden in den PCR-Ansatz transferiert und 150 μ l dYT-Medium mit dem restlichen Koloniematerial beimpft, um positiv getestete Klone weiter kultivieren zu können.

Die PCR-Proben wurden zum Zellaufschluss im Thermocycler für 2 min auf 95°C erhitzt. Anschließend folgten 30 PCR-Zyklen mit je 20 s bei 95°C (Strangtrennung), 20 sec bei 47°C (Hybridisierung) und 1 min bei 72°C (Polymerisation). Abschließend wurde eine 10-minütige Polymerisation bei 72°C zum Auffüllen eventuell unvollständiger PCR-Fragmente durchgeführt und die entstandenen PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.) analysiert.

2.3.3. Herstellung und Transformation elektrokompeter *E.coli* Zellen

Die besten Transformationsraten erreicht man mit Zellen, die aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden. Hierzu wurden 100 ml LB-Medium mit 200 μ l einer Übernachtskultur des gewünschten *E.coli* Stammes inokuliert und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 geschüttelt. Diese Zellen wurden bei 5000 rpm und 4°C 10 Minuten lang abzentrifugiert, in 100 ml ddH₂O resuspendiert, erneut zentrifugiert, und nacheinander (nach jeweiligem Abzentrifugieren) in 50 ml, 2 ml und abschließend 0,5 ml 10% Glycerin aufgenommen und zu je 40 μ l aliquotiert. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurde ein 40 μ l-Aliquot elektrokompeter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 μ l Plasmidlösung (ca. 50 ng DNA/ μ l) versetzt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte durch einen Elektropuls von 2500 V für 5 ms. Sofort anschließend wurden die Zellen in 500 μ l antibiotikumsfreies LB-Medium überführt und für 30 min bei 37°C inkubiert. 50 μ l dieser Zellsuspension wurden dann auf geeigneten Selektivmedien ausplattiert.

2.3.4. Lagerung transformierter Bakterien als Glycerinkulturen

Zur Konservierung von Bakterienstämmen wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt. Hierzu wurden 600 µl von einer Übernachtskultur in LB-Medium entnommen, zu 300 µl sterilem Glycerin gegeben, die Suspension kräftig gemischt und zwei Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C dauerhaft gelagert.

2.4. Gewinnung von Proteinen und Ribosomen

2.4.1. Gewinnung von (S54G/P55N)RNase T1 aus *E. coli* DH5α

RNase T1 wurde im *E. coli*-Stamm DH5α mit dem Plasmid pA2T1, das das entsprechende RNase T1-Gen trägt (Quaas *et al.* 1988), exprimiert. In diesem Gen ist eine Fusion mit dem Signalpeptid von OmpA codiert, so dass nach Induktion durch 1 mM IPTG die überexprimierte RNase T1 ins Periplasma von *E. coli* exportiert wird. Dort wird nach Abspalten der Signalsequenz das native, disulfidverbrückte Protein gebildet.

RNase T1 wurde durch osmotischen Schock aus dem Periplasma gewonnen (Neu & Heppel 1965) und gemäß dem von Mayr beschriebenen Protokoll gereinigt (Mayr & Schmid 1993b). Die Reinigung bestand aus einer Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Fractogel EMD-650 und einer Gelfiltrationschromatographie an Superdex 75. RNase T1-haltige Fraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit gereinigter (S54G/P55N)RNase T1 als Referenz identifiziert. Nach abschließender Dialyse gegen 10 mM Ammoniumacetat wurde das reine Protein schließlich lyophilisiert.

2.4.2. Gewinnung des Trigger-Faktors aus *E. coli*

Puffer A: 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH^{4°C} 7,25

Puffer B: 1 M NaCl, 20 mM HEPES pH^{4°C} 7,25

Puffer C: 20 mM Na-Succinat pH 5,8

Puffer D: 1 M NaCl, 20 mM Na-Succinat pH 5,8

Puffer E: 20 mM HEPES pH^{4°C} 7,25

Bei der Reinigung cysteinhaltiger Trigger-Faktorvarianten enthielten alle Puffer zusätzlich 1 mM EDTA und 1 mM β-Mercaptoethanol zur Verhinderung von Oxidationsreaktionen.

Die Überexpression der in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Trigger-Faktorvarianten erfolgte im *E. coli*-Stamm M15 mit dem Repressorplasmid pREP4 sowie der jeweiligen Variante des Expressionsplasmids pQETF. Die Zellen wurden in 5 l dYT-Medium bei 37°C fermentiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 wurde die Überexpression von Trigger-Faktor durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Bei Erreichen der stationären Wachstumsphase nach ca. 4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (GS3-Rotor, 8.000 rpm, 10 min, 4°C), in kaltem Puffer A aufgenommen (1 ml Puffer / g Zellmasse) und mit einer *Complete* Proteaseinhibitortablette versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges Passieren des Microfluidizers. Zellbestandteile, Ribosomen und größere Proteinkomplexe wurden durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen (SS34-Rotor, 19.000 rpm, 30 min, 4°C und Ultrazentrifugation im A-641-Rotor, 38.000 rpm, 2 h, 4°C) abgetrennt.

Abweichend vom Protokoll von Stoller *et al.* (1995) erfolgte die Reinigung lediglich durch zwei Anionentauscherchromatographien bei zwei verschiedenen pH-Werten. Der proteaseempfindliche

Trigger-Faktor sollte möglichst schnell ohne zeitaufwendiges Umpuffern gereinigt werden. Mit der hier beschriebenen Methode konnte auf schnellem Weg eine höhere Reinheit (Kriterium: Aktivitätseinheiten im RCM-T1-Rückfaltungstest pro A₂₈₀-Einheit) erreicht werden als mit dem Protokoll nach Stoller.

Beide Anionentauscherchromatographien erfolgten bei 4°C an DEAE-Fractogel EMD-650 (Säule XK 50/30; Gelvolumen ca. 150 ml). Für die erste Chromatographie wurde die Säule mit Puffer A äquilibriert. Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde mit einer Flussrate von 5 ml/min auf die Säule aufgepumpt. Nach Waschen mit 300 ml Puffer A erfolgte die Elution des Trigger-Faktors durch einen linearen Gradienten (300 ml) von 150 mM bis 500 mM NaCl mit dem Puffersystem A/B, wobei das Eluat in 5 ml Fraktionen aufgefangen wurde. Noch gebundene Proteine wurden durch 1 M NaCl (Puffer B) eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden im RCM-T1-Rückfaltungstest (s. 2.8.1.) auf ihre PPIaseaktivität getestet. Per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde außerdem kontrolliert, ob die aktiven Fraktionen auch tatsächlich vorwiegend Trigger-Faktor enthielten. Die aktivsten Trigger-faktorhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und mit dem dreifachen Volumen Puffer C versetzt.

Diese Lösung wurde erneut auf die nun mit 100 mM NaCl in Puffer C äquilibrierte Anionentauschersäule aufgetragen (5 ml/min). Mit dem Puffersystem C/D wurde die Säule nun mit 300 ml 100 mM NaCl gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution durch einen Gradienten (300 ml) von 100 mM bis 500 mM NaCl und abschließendes Waschen mit reinem Puffer D. Trigger-faktorhaltige Fraktionen wurden wieder durch Aktivitätsmessung identifiziert und vereinigt.

Zur Konzentrierung der nun nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese apparent reinen Trigger-Faktorpräparation wurde nochmals eine Bindung und Stufenelution an der Anionentauschersäule durchgeführt. Die Trigger-Faktorprobe wurde erneut mit dem dreifachen Volumen an Puffer C versetzt und auf die mit 100 mM NaCl in Puffer C äquilibrierte Anionentauschersäule aufgetragen. Eluiert wurde nun mit einem kleinen Volumen Puffer durch einen Sprung auf 1,0 M NaCl (Puffer D).

Das Trigger-faktorhaltige Eluat wurde nun viermal 12 h gegen jeweils erneuerten Puffer E dialysiert (Spectra/Por-Dialysesschläuche, Ausschlussgrenze 6-8 kDa). Nach der Dialyse wurde Trigger-Faktor aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Cysteinhaltige Trigger-Faktorvarianten für spätere Fluoreszenzmarkierung wurden ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.4.3. Isolierung von 70S-Ribosomen aus *E.coli* JC7623Δ*tig*

Puffer A: 10 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 0,3 M NH₄Cl, 0,5 mM DTT, 20 mM Tris/HCl pH^{4°C} 7,5

Puffer B: 1,1 M Sucrose in Puffer A

Puffer C: 10 mM MgCl₂, 1 M NH₄Cl, 1 mM DTT, 20 mM Tris/HCl pH^{4°C} 7,5

70S-Ribosomen wurden aus *E. coli* JC7623Δ*tig* isoliert. In diesem Stamm ist das Trigger-Faktorgen *tig* durch eine Insertion inaktiviert (Teter *et al.* 1999). 10 l dYT-Medium mit 25 µg/ml Cm wurden mit 200 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* JC7623Δ*tig* beimpft und unter Luftzufuhr bei 37°C inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde anhand der OD₆₀₀ kontrolliert. Bei Erreichen der stationären Wachstumsphase (OD₆₀₀ ca. 2,5-3) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (GS3-Rotor, 8.000 rpm, 10 min, 4°C) und anschließend in kaltem Puffer A aufgenommen (1 ml Puffer / g Zellmasse). Alle weiteren Reinigungsschritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C nach dem Protokoll zur Reinigung von *tight couple* 70S-Ribosomen durchgeführt (Spedding 1990).

Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges Passieren des Microfluidizers. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (SS34-Rotor, 19.000 rpm, 30 min) und der Überstand anschließend in T-865-Ultrazentrifugenröhrchen vorsichtig auf ein 10 ml Polster aus Puffer B geschichtet. Nach Ultrazentrifugation (A-641-Rotor, 45.000 rpm, 10 h) wurde der Überstand verworfen, das Ribosomenpellet in kaltem Puffer C resuspendiert und 1 h bei 16.000 rpm im SS-34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut auf ein 10 ml Polster Puffer B geschichtet und ultrazentrifugiert (s.o.). Erneut wurde das Ribosomenpellet in Puffer C aufgenommen und zentrifugiert (SS-34, 16.000 rpm, 1 h). Die beiden Ammoniumchlorid-Waschschritte mit Puffer C dienten dem Entfernen ribosomenassoziierter Proteine. Der Überstand des letzten Waschschrittes wurde erneut ultrazentrifugiert (ohne Sucrosepolster), das Ribosomenpellet vorsichtig mit Puffer A gewaschen und abschließend in 2 ml Puffer A aufgenommen. Photometrisch wurde die Ribosomenkonzentration bestimmt (1 A_{260} entspricht 25 pmol Ribosomen). Die Ribosomenlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5. Modifikation von Proteinen

2.5.1. Reduktion und Carboxymethylierung/Carbamidomethylierung

Reduktionspuffer: 50 mM DTT, 7 M GdmCl, 2 mM EDTA, 200 mM Tris/HCl $\text{pH}^{20^{\circ}\text{C}}$ 8,7

Modifikationslösung: 0,6 M Natriumiodacetat (für RCM-Proteine) bzw. Iodacetamid (für RCAM-Proteine), 200 mM Tris/HCl $\text{pH}^{20^{\circ}\text{C}}$ 7,5

Die Reduktion und Modifikation der Varianten von RNase T1 und Lactalbumin erfolgte nach der für Wildtyp-RNase T1 publizierten Methode (Mücke & Schmid 1994b). Dazu wurden 10 mg Protein in 350 μl Reduktionspuffer gelöst und 60 bis 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Carboxymethylierung (RCM-Proteine) bzw. Carbamidomethylierung (RCAM-Proteine) wurde der Reaktionsansatz mit 60 μl Modifikationslösung versetzt und fünf Minuten lang im Dunkeln inkubiert. Unmittelbar darauf wurde der Ansatz durch zweimaliges Passieren einer NAP-10-Säule entsalzt. Die Vollständigkeit der Reaktion und die Homogenität des Reaktionsprodukts wurden mit einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 2.2.2.) überprüft. Zur Aufbewahrung wurden die Proben aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.5.2. Fluoreszenzmarkierung cysteinhaltiger Trigger-Faktorvarianten

Puffer A: 1 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl $\text{pH}^{20^{\circ}\text{C}}$ 7,5

TCEP-Lösung: 100 mM TCEP in ddH_2O

Acrylodan-Lösung: 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Acrylodan in N,N-Dimethylformamid

BADAN-Lösung: 80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BADAN in N,N-Dimethylformamid

20 mg der zu modifizierenden lyophilisierten Trigger-Faktor-Variante wurden in 1 ml Puffer A gelöst, zur Reduktion mit 10 μl TCEP-Lösung versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden je nach gewünschter Modifikation 10 μl Acrylodan-Lösung, 10 μl BADAN-Lösung oder 1,2 mg IAEDANS (IAEDANS ist wasserlöslich) zugegeben und der Markierungsansatz 90 min bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt. Nach Zentrifugation wurden überschüssige Reagenzien durch zweimaliges Passieren einer NAP-10-Säule entfernt. Zur Aufbewahrung wurden die Proben aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Die Markierungseffizienz von BADAN-Trigger-Faktor wurde von Christine Magg durch Messung an einem Micromass LCT ESI-TOF Massenspektrometer (Arbeitsgruppe Prof. Unverzagt) überprüft. Der Anteil an mono-markiertem Trigger-Faktor lag demnach bei über 85 %. Zur Konzentrationsbestimmung des fluoreszenzmarkierten Trigger-Faktors wurde der kolorimetrische Test nach Bradford benutzt, wobei unmarkierter Trigger-Faktor bekannter Konzentration als Referenz eingesetzt wurde.

2.6. Spektroskopische Methoden

Generell wurden sämtliche Puffer für spektroskopische Messungen vor Verwendung durch 0,45 µm Nylonfilter filtriert und anschließend mit einer Membranvakuumpumpe entgast. Proteinlösungen wurden vor Messungen durch Zentrifugation von Aggregaten und anderen nichtlöslichen Bestandteilen befreit.

2.6.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

UV-Absorptionsspektren von Proteinlösungen wurden an einem Kontron Uvikon 860 Absorptionsspektrophotometer in Quarzküvetten der Schichtdicke 1 cm bei 25 °C von 240 nm bis 350 nm (im Falle fluoreszenzmarkierter Proteine bis 450 nm) gegen den entsprechenden Puffer als Referenz aufgenommen. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 50 nm/min, die Bandbreite war 2 nm.

Mit Hilfe des Absorptionswertes bei 260, 278 oder 280 nm wurde die Konzentration von Ribosomen- oder Proteinlösungen über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt. Für die verschiedenen Proteine wurden folgende Extinktionskoeffizienten herangezogen, die teilweise auf Basis der Aminosäuresequenz nach der Methode von Gill & von Hippel berechnet wurden (Gill & von Hippel 1989):

70S-Ribosomen	$\epsilon_{260} = 4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	(Spedding 1990)
Citratsynthase	$\epsilon_{280} = 87.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	(West <i>et al.</i> 1990)
RNase T1 (alle Varianten)	$\epsilon_{278} = 21.060 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	(Takahashi <i>et al.</i> 1970)
Trigger-Faktor aus <i>E. coli</i> :	$\epsilon_{278} = 18.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	
Trigger-Faktor aus <i>M. genitalium</i> :	$\epsilon_{280} = 21.050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	(Scholz 1999)
RCM-Lactalbumin:	$\epsilon_{280} = 27.880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	(Kuwajima 1989)

Da der tryptophanfreie Trigger-Faktor (TF W151F) nur schwach absorbiert, wurde seine Konzentration durch Vergleich seines Fern-UV-CD-Spektrums mit dem von Wildtyp-Trigger-Faktor bekannter Konzentration ermittelt.

2.6.2. Fluoreszenzemissionsspektren

Alle Fluoreszenzspektren wurden mit einem Hitachi F-4500 Spektrofluorimeter in thermostatisierten verspiegelten Halbmikro-Fluoreszenzrührküvetten aufgenommen. Sowohl Anregungs- als auch Emissionsbandbreite betrugen 5 nm. Die Spektren wurden bei konstanter Anregungswellenlänge mit einer Dämpfung von 0,5 s und einer Scangeschwindigkeit von 60 nm/min aufgezeichnet und nachträglich um die Pufferfluoreszenz korrigiert, um insbesondere den Ramanpeak des Wassers zu eliminieren.

2.6.3. Circular dichroismus-Spektren

Zur Ermittlung von CD-Spektren wurde ein Jasco J-600 A Spektropolarimeter mit thermostatisierten Küvetten der Schichtdicke 1 mm verwendet. Die Spektren wurden mit 20 nm/min bei einer Dämpfung von 1 s und einer Spaltbreite von 1 nm im Bereich von 190 - 250 nm aufgenommen. Alle Spektren wurden je achtmal gemessen, anschließend gemittelt und um das Pufferspektrum korrigiert. Die Proteinkonzentration betrug ca. 4 μ M.

Zur Ermittlung der Konzentration von W151F-Trigger-Faktor diente ein Vergleich seines CD-Spektrums mit dem von Wildtyp-Trigger-Faktor bekannter Konzentration, da sich die eingeführte Mutation kaum auf die dreidimensionale Struktur und somit auf das Fern-UV-CD-Spektrum des Trigger-Faktors auswirken sollte. Dazu wurden unter identischen Bedingungen die Fern-UV-CD-Spektren von Wildtyp-Trigger-Faktor bekannter Konzentration und W151F-Trigger-Faktor ähnlicher Konzentration (absorptionsspektroskopisch abgeschätzt) aufgenommen. Das Spektrum von W151F-Trigger-Faktor wurde dann mit einem Faktor Z multipliziert, so dass sich beide Spektren deckten. Die Konzentration der W151F-Trigger-Faktorprobe wurde dann aus der bekannten Konzentration des Wildtyp-Trigger-Faktors und dem benutzten Faktor Z errechnet.

2.7. Proteasegekoppelter Prolylisomerasetest

Anhand des proteasegekoppelten Prolylisomerasetests kann die Aktivität von PPIasen gegenüber kurzen chromogenen Peptiden getestet werden. Wie schon in der Einleitung beschrieben, haben Fischer und Mitarbeiter dieses Testsystem erarbeitet, das die isomerspezifische Proteolyse eines chromogenen Oligopeptids durch Chymotrypsin nutzt (Fischer *et al.* 1984). In dieser Arbeit wurde für Aktivitätsbestimmungen die überarbeitete Methode nach Kofron verwendet (Kofron *et al.* 1991).

Chymotrypsin hydrolysiert im Testpeptid Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA die Amidbindung zwischen Phenylalanin und para-Nitroanilin nur dann effizient, wenn alle Peptidbindungen im Substrat in *trans*-Konformation vorliegen. Die Freisetzung von para-Nitroanilin ($\Delta\epsilon_{390} = 13.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kann über die Absorptionzunahme verfolgt werden. Nur die Peptidbindung vor Prolin liegt zu einem gewissen Anteil in *cis* vor. In wässriger Lösung liegt dieser Anteil im Gleichgewicht bei ca. 10 %. Löst man das Testpeptid in wasserfreiem Trifluorethanol mit 0,45 M LiCl, so erhöht sich der *cis*-Anteil auf 50-70 %. Bringt man daher das so gelöste Testpeptid per Handmischung in wässrige Chymotrypsinlösung, so werden alle in *trans* vorliegenden Testpeptide bereits innerhalb der Totzeit der Messung hydrolysiert, während die Hydrolyse der übrigen Peptide zeitlich durch die *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung limitiert ist. Diese kann anhand der Absorptionzunahme beobachtet werden.

PPIase-Aktivitätstests wurden an einem Hewlett Packard 8652-Diodenarray Photometer bei 15°C in thermostatisierten Halbmikro-Rührküvetten mit Schichtdicke 1 cm in einem Gesamtvolumen von 900 μ l durchgeführt. Chymotrypsin wurde mit Messpuffer (100 mM Tris/HCl pH^{15°C} 8,0) 10 min unter Rühren in der Küvette vortemperierte. Dann wurde die ebenfalls vortemperierte Enzymlösung mit der zu messenden PPIase zugegeben (als Referenz wurde die Isomerisierung auch einmal in Abwesenheit von PPIase gemessen). Unmittelbar darauf wurde die Reaktion durch Zupipettieren von 9 μ l einer 7,8 mM Testpeptidlösung (in 0,45 M LiCl in 2,2,2-Trifluorethanol) gestartet. Die Konzentration an Chymotrypsin im Testansatz lag somit bei 30 μ M, die des Testpeptids bei 78 μ M. Durch Messung der Absorption bei 390 nm (die Absorption bei 500 nm wurde jeweils als interne Referenz abgezogen) wurde dann der Verlauf der *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung beobachtet.

Für die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion erster Ordnung gilt hier:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = k_{app} \cdot [S] \quad (2-3)$$

Die Konzentration des *cis*-Isomers folgt somit dem einfachen Zeitgesetz:

$$[S]_t = [S]_0 \cdot \exp \{-k_{app} t\} \quad (2-4)$$

Durch Angleich einer monoexponentiellen Funktion an den zeitlichen Absorptionsverlauf A_{390} - A_{500} erhält man die apparente Geschwindigkeitskonstante k_{app} der Isomerisierung für die jeweilige PPIase-Konzentration. Da sich die Isomerisierungsreaktion aus den Beiträgen der unkatalysierten (spontanen) und der enzymatisch katalysierten Reaktion zusammensetzt, folgt für solch eine Reaktion in Anlehnung an die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = k_{uncat} \cdot [S] + k_{cat} \cdot [E]_0 \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2-5)$$

Unter der Voraussetzung $[S] \ll K_M$ (und diese Voraussetzung ist für die Standardbedingungen des proteasegekoppelten Tests und die untersuchten Prolylisomerasen erfüllt) vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$v = k_{uncat} \cdot [S] + \frac{k_{cat}}{K_M} [S] \cdot [E]_0 \quad (2-6)$$

Kombiniert man diese Gleichung mit Gleichung (2-3), so folgt

$$k_{app} \cdot [S] = k_{uncat} \cdot [S] + \frac{k_{cat}}{K_M} [S] \cdot [E]_0 \quad \text{bzw.} \quad k_{app} = k_{uncat} + \frac{k_{cat}}{K_M} \cdot [E]_0 \quad (2-7)$$

Trägt man also die ermittelte apparente Geschwindigkeitskonstante gegen die eingesetzte PPIasekonzentration auf, so lässt sich aus der Steigung der Werte die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M für die katalytische Effizienz des Enzym-Substratpaares ablesen.

2.8. Faltungsexperimente mit RCM-T1 und apo-Lactalbumin

2.8.1. Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch PPIasen

Die Rückfaltung von RCM-T1 in Gegenwart von PPIasen wurde in einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter in thermostatierten verspiegelten Halbmikro-Fluoreszenzrührküvetten in einem Gesamtvolumen von 900 μ l aufgenommen. RCM-T1 wurde durch mindestens 60-minütige Inkubation in 100 mM Tris/HCl pH^{15°C} vollständig entfaltet. Die Rückfaltung bei 15°C wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung des entfalteten Proteins in Endbedingungen von 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH^{15°C} 8,0 und in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an PPIase. Die Konzentration an RCM-T1 im Faltungsansatz betrug je nach Isomerase 0,1 bis 0,5 μ M.

Der Verlauf der Faltungsreaktion wurde nach Anregung bei 268 nm (1,5 nm Bandbreite) über die Zunahme der Fluoreszenz bei 320 nm (10 nm Bandbreite, Dämpfung 0,5 s) beobachtet. Um eine Zerstreuung der Probe bei langen Messungen zu verhindern, wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des Programmes Kinhit nach 14 min nicht mehr kontinuierlich, sondern nur noch periodisch gemessen. Der Beitrag von PPIasen und Puffer zur Fluoreszenz wurde von den Messwerten jeweils abgezogen.

Bei 15°C und 2,0 M NaCl verlief die langsame Phase der Faltung von RCM-T1 nach einem monoexponentiellen Zeitgesetz und die apparente Ratenkonstante k_{app} des Faltungsverlaufs wurde mit Hilfe des Programms GraFit 3.0 für jede PPIasekonzentration ermittelt.

Für die numerische Auswertung gelten die gleichen Prinzipien, egal ob es sich beim Substrat um ein kurzes chromogenes Peptid (s. 2.7.) oder ein entfaltetes Protein handelt. Trägt man daher die ermittelte apparente Geschwindigkeitskonstante der RCM-T1-Rückfaltung gegen die eingesetzte PPIasekonzentration auf, so lässt sich gemäß Gleichung (2-7) aus der Steigung der Werte die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M für die katalytische Effizienz der PPIase im RCM-T1-Rückfaltungstest ermitteln.

2.8.2. Katalyse der Rückfaltung von RCAM-T1(4X) durch PPIasen

Zur Messung von PPIaseaktivitäten bei höheren Temperaturen als 15°C war es nötig, ein Testsubstrat zu verwenden, das auch noch bei höheren Temperaturen eine nativähnliche Struktur einnimmt. Anstelle von RCM-T1 wurde nun die carbamidomethylierte Form von Ribonuklease T1(4X) (RCAM-T1(4X)) verwendet. Diese von Volker Sieber mit Hilfe der PROSIDE-Methode gewonnene stabilisierte Variante enthält zusätzlich zu der Mutation S54G/P55N die drei Mutationen S17A, D29N und Y42F, welche das Protein um etwa 10 kJ/mol im Vergleich zur RNase T1(S54G/P55N) stabilisieren (Sieber 1998). Außerdem wurde die Modifikation des Proteins nach reduktivem Öffnen der Disulfidbrücken mit Iodacetamid statt mit Iodacetat durchgeführt. Dadurch wurden die Thiolgruppen der Cysteine mit ungeladenen Carbamidomethylgruppen modifiziert. Diese führen anders als die negativ geladenen Carboxymethylgruppen nicht zu einer Destabilisierung aufgrund elektrostatischer Abstoßung. Während der Mittelpunkt des NaCl-induzierten Faltungsübergangs (s. Abb. 3-25) bei pH 8,0 und 15°C von RCM-T1 bei 1,0 M NaCl liegt, liegt dieser für RCAM-T1(4X) bei 0,12 M (Sieber 1998). Außerdem konnte Volker Sieber zeigen, dass die Stabilität von RCAM-T1(4X) noch weiter zunimmt, wenn man pH 6,0 statt 8,0 wählt (Sieber, nicht veröffentlichte Ergebnisse). Somit ermöglichten Rückfaltungstests mit RCAM-T1(4X) auch Messungen bei 25°C und 35°C.

Die Messungen erfolgten wie mit RCM-T1 (2.8.1.), jedoch mit folgenden Abweichungen:

- **Entfaltung von RCAM-T1(4X):** 60 min bei 35°C in 100 mM MES pH 6,0
- **Testpuffer:** 3,0 M NaCl, 100 mM MES pH 6,0
- **Faltungstemperatur:** 15°C, 25°C, 35°C

Die Auswertung erfolgte wie bei RCM-T1 durch Auftragung der ermittelten apparenten Rate der Rückfaltung gegen die eingesetzte PPIasekonzentration.

2.8.3. Inhibition von Trigger-Faktor durch entfaltete Proteine

Permanent entfaltete Proteine wie reduziertes und carboxymethyliertes α -Lactalbumin (RCM-La) können Trigger-Faktor kompetitiv inhibieren (Scholz 1999). Die Messung der Inhibition des tryptophanfreien Trigger-Faktors (TF W151F) durch RCM-La bei der Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 erfolgte wie in Kapitel 2.8.1. beschrieben. Vorgelegt in der Küvette wurden Messpuffer, 30 μ M TF W151F und zusätzlich 0-5 μ M RCM-La. Die Reaktion wurde wieder gestartet durch 100-fache Verdünnung der entfalteten RCM-T1 in Endbedingungen von 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH^{15°C} 8,0.

Kompetitive Inhibition bedeutet, dass ein Teil der Isomerasemoleküle durch Bindung eines Inhibitormoleküls gerade nicht als Katalysator zur Verfügung steht. Für die Komplexbildung zwischen Enzym und Inhibitor lautet die Definition der Dissoziationskonstante K_D :

$$K_D = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} = \frac{([E]_0 - [EI]) \cdot ([I]_0 - [EI])}{[EI]} \quad (2-8)$$

[E]: Konzentration an freiem Enzym; [I]: Konzentration an freiem Inhibitor; [EI]: Konzentration an Enzym-Inhibitor-Komplex; $[E]_0$: Gesamtkonzentration des Enzyms; $[I]_0$: Gesamtkonzentration des Liganden

Die obige quadratische Gleichung lässt sich nach [EI] auflösen. Unter der Annahme, dass die Komplexkonzentration klein ist im Vergleich zur Gesamtkonzentration des Inhibitors ($[I] \approx [I]_0$), lässt sich diese Auflösung vereinfachen zu einer hyperbolischen Beschreibung der Komplexbildung:

$$[EI] = [E]_0 \cdot \frac{[I]_0}{[I]_0 + K_D} \quad (2-9)$$

Unter den gewählten Konzentrationsbedingungen ($[S] \ll K_M$) nimmt die apparente Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung linear mit der Enzymkonzentration zu (s. Gleichung 2-7). Die Abnahme der Katalyse in Gegenwart des Inhibitors ist daher ein Maß für den Anteil an Enzym, der aktuell an Inhibitor gebunden ist. Die gemessene apparente Rate der Rückfaltung (k_{app}) nimmt daher beginnend von der maximalen, nicht inhibierten Rate (k_{max}) mit steigender Konzentration an Inhibitor hyperbolisch ab, bis sie im Unendlichen die Rate der nicht katalysierten Reaktion (k_{uncat}) erreicht:

$$k_{app} = k_{max} - (k_{max} - k_{uncat}) \cdot \frac{[I]_0}{[I]_0 + K_D} \quad (2-10)$$

Somit lässt sich aus der Auftragung der apparenten Rate der katalysierten Rückfaltung gegen die eingesetzte Inhibitorkonzentration durch einen hyperbolischen Angleich nach Formel 2-10 die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes ermitteln.

2.8.4. Entfaltung von RCM-T1 durch Trigger-Faktor

Es sollte getestet werden, ob Trigger-Faktor durch bevorzugte Bindung entfalteter Proteine in der Lage ist, ein nur marginal stabiles Protein zu entfalten. Dazu wurde RCM-T1 bei 1,5 M NaCl verwendet, da bei diesen Bedingungen bereits etwa 10 % der Proteinmoleküle entfaltet vorliegen (s. Abb. 3-12). Die Messung der Entfaltung von RCM-T1 durch Trigger-Faktor erfolgte im Prinzip wie die Messung der Rückfaltung (2.8.1.) in verspiegelten Fluoreszenzrührküvetten.

RCM-T1 wurde durch mindestens 60-minütige Inkubation in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH^{15°C} 8,0 gefaltet. Die Entfaltung bei 15°C wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung des gefalteten Proteins in Endbedingungen von 1,5 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH^{15°C} 8,0 in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an TF W151F. Die Konzentration an RCM-T1 im Entfaltungsansatz betrug 1 µM. Da für diese Messungen deutlich höhere Trigger-Faktorkonzentrationen als bei der Rückfaltungskatalyse notwendig waren, erfolgte die Anregung bei 295 nm (Bandbreite 1,5 nm), einer Wellenlänge, bei der der verwendete TF W151F kaum noch absorbiert. Daher wurde dieses Experiment mit der Variante TF W151F durchgeführt. Beobachtet wurde die Abnahme der Fluoreszenz bei 320 nm (Bandbreite

5 nm, Dämpfung 0,5 s). Der Beitrag von TF W151F und Puffer zur Fluoreszenz wurde von den Messwerten jeweils abgezogen.

Die langsame Phase der Entfaltung von RCM-T1 verlief nach einem monoexponentiellen Zeitgesetz und die apparente Ratenkonstante und die Amplitude des Entfaltungsverlaufs wurden mit Hilfe des Programms GraFit 3.0 für jede Trigger-Faktorkonzentration berechnet. Aus der Auftragung der gemessenen Fluoreszenzamplitude gegen die Trigger-Faktorkonzentration ließ sich mit Hilfe einer hyperbolischen Bindungskurve die apparente Bindungskonstante für die Komplexbildung zwischen TF W151F und RCM-T1 berechnen.

2.8.5. Verlangsamung der Faltung von RCM-T1 durch Trigger-Faktor

PPlasen sollten die Proteinfaltung dadurch beschleunigen, dass sie die Isomerisierung von nicht-nativen Prolylbindungen zur nativen Konformation katalysieren. In diesem Experiment sollte gezeigt werden, dass Trigger-Faktor auch zu Faltungsverzögerungen führen kann, wenn er die Isomerisierung einer Peptidbindung vom schnell faltenden Isomer (U_F) zum langsam faltenden Isomer (U_S) katalysiert. Durch einen kurzen Entfaltungspuls wurde der schnell rückfaltende Zustand U_F von RCM-T1 populiert. Dann wurde der Einfluss steigender Konzentrationen an Trigger-Faktor auf das Rückfaltungsverhalten beobachtet. Um hohe Konzentrationen an Trigger-Faktor einsetzen zu können, wurde die schwach fluoreszierende Variante TF W151F verwendet.

Die Messungen erfolgten in einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter in thermostatierten verspiegelten Halbmikro-Fluoreszenzrührküvetten bei 15°C in einem Gesamtvolumen von 900 µl. RCM-T1 (110 µM) wurde 1 Stunde lang in 1,8 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH^{15°C} 8,0 gefaltet, 11-fach verdünnt in Entfaltungsbedingungen von 0,16 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH^{15°C} 8,0 (vgl. Abb. 3-12) und dort 10 s inkubiert, um das U_F -Isomer zu populieren. Anschließend erfolgte 10-fache Verdünnung in die Messküvette auf eine Endkonzentration von 1 µM in 2 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH^{15°C} 8,0 und 0-4 µM TF W151F. Die Rückfaltung wurde beobachtet durch die Fluoreszenzzunahme bei 320 nm nach Anregung bei 295 nm (Bandbreite 1,5 nm). Der Beitrag von TF W151F und Puffer zur Fluoreszenz wurde von den Messwerten jeweils abgezogen.

2.8.6. Verlangsamung der Rückfaltung von apo- α -Lactalbumin durch Trigger-Faktor

Apo- α -Lactalbumin (apo-La) unterscheidet sich vom natürlichen α -Lactalbumin dadurch, dass es keine Ca^{2+} -Ionen enthält. Dies lässt sich dadurch erreichen, dass man α -Lactalbumin in einem EGTA-haltigen Puffer entfaltet. EGTA entzieht dem entfalteten Lactalbumin sämtliche Calciumionen, indem es mit ihnen einen sehr starken Komplex bildet.

Apo-La bildet bei seiner Rückfaltung sehr schnell ein teilgefaltetes *molten globule* Intermediat, das sich dann im geschwindigkeitsbestimmenden zweiten Faltungsschritt langsam in den nativen Zustand umwandelt (Arai & Kuwajima 1996; Kuwajima 1996). Bei beiden Teilschritten auf dem Weg vom ungefalteten zum nativen Protein nimmt die Tryptophanfluoreszenz des Lactalbumins ab, wobei die Gleichgewichtseinstellung des ersten Schrittes so schnell erfolgt, dass dieser nach Handmischung nicht mehr verfolgt werden kann. Nun sollte überprüft werden, welchen Einfluss Trigger-Faktor auf den geschwindigkeitsbestimmenden zweiten Faltungsschritt von apo-La nimmt. Um hohe Konzentrationen an Trigger-Faktor einsetzen zu können, wurde die schwach fluoreszierende Variante TF W151F verwendet.

Die Messungen erfolgten in einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter in thermostatierten verspiegelten Halbmikro-Fluoreszenzrührküvetten bei 15°C in einem Gesamtvolumen von 900 µl. Apo-La

wurde 1 Stunde lang in 6 M GdmCl, 5 mM EGTA, 100 mM Tris/HCl pH^{15°C} 8,0 entfaltet. Die Rückfaltung wurde induziert durch 90-fache Verdünnung auf 2,0 μ M apo-La in 67 mM GdmCl, 5 mM EGTA, 2,0 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 und über die Fluoreszenzänderung bei 340 nm (Bandbreite 20 nm; Dämpfung 0,5 s) nach Anregung bei 295 nm (Bandbreite 3,0 nm) beobachtet. Der Beitrag von TF W151F und Puffer zur Fluoreszenz wurde von den Messwerten jeweils abgezogen. An die Fluoreszenzkurven wurden monoexponentielle Funktionen angeglichen. Sowohl die ermittelte Amplitude als auch die Faltungsrate wurden gegen die Trigger-Faktorkonzentration aufgetragen. Durch Angleich einer hyperbolischen Bindungskurve ließ sich so die apparente Dissoziationskonstante für den Komplex aus (entfaltetem) apo-La und TF W151F ermitteln.

2.9. Bindungseigenschaften des Trigger-Faktors

2.9.1. Kinetik der Substratbindung und -freisetzung des Trigger-Faktors

Christian Scholz konnte zeigen, dass Trigger-Faktor durch die permanent entfalteten reduzierten und carboxymethylierten Varianten von α -Lactalbumin (RCM-La) und von P39A-Ribonuklease T1 (RCM-P39A-T1) kompetitiv inhibiert wird (Scholz 1999). Nun sollte die Dynamik der Wechselwirkung dieser beiden Substratanaloga mit Trigger-Faktor bestimmt werden.

Die Kinetik der Bindung und Freisetzung von RCM-La und RCM-P39A-T1 durch den Trigger-Faktor wurde in einem DX 17MV *Sequential Stopped-flow* Spektrofluorimeter gemessen. Als Sonde für die Komplexbildung diente die im Vergleich zur Summe der Einzelfluoreszenzen erhöhte integrale Fluoreszenz des Komplexes oberhalb von etwa 330 nm. Um hohe Konzentrationen an Trigger-Faktor einsetzen zu können, wurde die schwach fluoreszierende Variante TF W151F verwendet. Die Anregung erfolgte bei 280 nm und einer Bandbreite von 9,4 nm in einer Beobachtungszelle von 10x2x2 mm. Zur Absorption von Streulicht und Fluoreszenzlicht unterhalb 330 nm, welches keinen Beitrag zur erhöhten Komplexfluoreszenz liefert, diente eine acetongefüllte 5 mm-Küvette vor dem Photomultiplier. Dadurch wurde Licht unterhalb 330 nm vollständig, das Fluoreszenzlicht oberhalb 340 nm hingegen zu weniger als 10 % absorbiert. Vorschubspritzen, Schlauchverbindungen und Messzelle wurden mit einem Haake Thermostat auf 15°C temperiert. Sämtliche Lösungen wurden vor der Messung in den Vorschubspritzen für mindestens 5 min vortemperiert. Der Vorschubdruck der Spritzen betrug 2,5 bar, die Beobachtungsdauer der Fluoreszenz mindestens 5 Zeitkonstanten.

Zur Messung der Assoziation von RCM-La und Trigger-Faktor wurden 2 μ M RCM-La bzw. 2 μ M RCM-P39A-T1 und verschiedene Konzentrationen (0-100 μ M) an TF W151F in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH^{15°C} 8,0 im Volumenverhältnis 1:1 miteinander gemischt, so dass die jeweiligen Endkonzentrationen bei 1 μ M und 0-50 μ M lagen. Je nach relativer Amplitude der Fluoreszenzänderung wurden für jedes Proteinkonzentrationsverhältnis 14 bis 110 Einzelkinetiken gemessen und gemittelt. Die Fluoreszenz des reinen Puffers wurde durch eine geringe Gegenspannung auf null gesetzt. In Kontrollexperimenten wurde sowohl Trigger-Faktor als auch RCM-La bzw. RCM-P39A-T1 1:1 mit proteinfreiem Puffer gemischt, um zu zeigen, dass es sich bei der beobachteten Fluoreszenzänderung nicht um ein Messartefakt handelt.

Die gemessenen Zeitverläufe für die Assoziation von RCM-La und Trigger-Faktor wurden gemittelt und durch die Summe aus zwei Exponentialfunktionen angeglichen. Die ermittelten Raten und Amplituden wurden gegen die Trigger-Faktorkonzentration aufgetragen. Durch den Angleich einer hyperbolen Bindungskurve an die aufgetragene Amplitude der schnellen Phase wurde die apparente Dissoziationskonstante für den Komplex aus RCM-La und Trigger-Faktor ermittelt.

Da die Rate der schnellen Assoziationsphase nicht linear, sondern ebenfalls nahezu hyperbolisch zunimmt, wurde ein zweistufiges Bindungsmodell angenommen (Schema 2-1), bei dem der schnellen Bildung eines initialen Kollisionskomplexes eine strukturelle Umlagerung folgt, welche zur beobachteten Fluoreszenzänderung führt. Die Daten wurden daher nach Formel 2-12 ausgewertet.



Schema 2-1: Zweistufiges Modell für die Komplexbildung von RCM-La und Trigger-Faktor.

LA bezeichnet die freie Form von RCM-La, TF die freie Form von Trigger-Faktor, LA·TF den initialen Komplex aus beiden und LA·TF* den sekundären Komplex, dessen Bildung die beobachtete Fluoreszenzänderung bewirkt.

Für die Dissoziationskonstanten dieses Modells gilt:

$$K_D = k_{\text{off}} / k_{\text{on}} \quad (2-11a)$$

$$K_{\text{iso}} = k_{-2} / k_{+2} \quad (2-11b)$$

$$K_D(\text{app}) = K_D \cdot K_{\text{iso}} = (k_{\text{off}} \cdot k_{-2}) / (k_{\text{on}} \cdot k_{+2}) \quad (2-11c)$$

Erfolgt die Gleichgewichtseinstellung des ersten Schrittes schnell im Vergleich zum zweiten Schritt, so gilt für die apparenten Raten k_{app} der Gleichgewichtseinstellung (Bagshaw *et al.* 1974; John *et al.* 1990):

$$k_{\text{app}} = k_{-2} + \frac{k_{+2} \cdot [\text{TF}]}{K_D + [\text{TF}]} \quad (2-12)$$

Zur Messung der Dissoziation des Komplexes aus RCM-La bzw. RCM-P39A-T1 und Trigger-Faktor wurde eine Lösung aus je 1 μM Trigger-Faktor und RCM-La bzw. RCM-P39A-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH^{15°C} 8,0 im Volumenverhältnis 1:11 mit dem gleichen (proteinfreien) Puffer verdünnt. Aufgrund der relativ geringen Fluoreszenzamplitude wurden mehr als 100 Kinetiken gemessen und gemittelt. In Kontrollexperimenten wurden die Fluoreszenzverläufe nach 1:11 Verdünnung von Trigger-Faktor und von RCM-T1 bzw. RCM-P39A-T1 in Abwesenheit des jeweiligen Bindungspartners gemessen.

Die Assoziation und Dissoziation von TF W151F und RCM-La wurde zusätzlich in Gegenwart und Abwesenheit von 100 μM ATP und 100 μM GTP gemessen, um festzustellen, ob Nukleotide einen Einfluss auf die Proteinbindungseigenschaften von Trigger-Faktor haben.

2.9.2. Substratspezifität des Trigger-Faktors: Bindungsstellen in einer Peptidbibliothek

TBS-Puffer:	137 M NaCl, 2,7 mM KCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,0
Kathodenlösung:	25 mM Tris-Base, 40 mM 6-Amino-Hexansäure, 20 % Methanol
Anodenlösung 1:	30 mM Tris-Base, 20 % Methanol
Anodenlösung 2:	300 mM Tris-Base, 20 % Methanol
Färbelösung:	0,1 % Amidoschwarz, 10 % Essigsäure, 25 % Isopropanol
Entfärbelösung:	0,5 M NaCl; 1 % Tween 20, 50 mM Tris/HCl pH 7,5
TBT-Puffer:	150 mM NaCl; 0,2 % Tween 20, 50 mM Tris/HCl pH 7,5
Peroxidase-Testlösung:	0,018 % 4-Chlor-1-Naphthol, 0,024 % H ₂ O ₂ , 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 6,0

Mit Hilfe einer Peptidbibliothek (zur Verfügung gestellt von M. Schutkowski, Halle) sollten die bevorzugten Bindungsstellen des Trigger-Faktors innerhalb der Sequenz von α -Lactalbumin identifiziert werden. Die Bibliothek bestand aus membrangekoppelten Peptiden mit jeweils 13 Aminosäuren, die jeden möglichen 13er-Ausschnitt des α -Lactalbumins repräsentierten (Aminosäuren 1-13, 2-14, ... 130-142; die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz im Lactalbumin-Vorläuferprotein). Gleichzeitig wurden auch Peptide mit gegenläufiger Aminosäureabfolge (AS 142-130, 141-129, ... 13-1) eingesetzt, um zu ermitteln, ob die Reihenfolge der Aminosäuren im Substrat für die Erkennung des Trigger-Faktors eine Rolle spielt.

Anhand einer ähnlichen Peptidbibliothek hatte Gerlind Stoller (Halle) die Trigger-Faktor-Bindungsstellen der Ribonuklease T1 identifiziert. Als stärkste Bindungsregion erwies sich der Bereich um Pro39 (G. Stoller, persönliche Mitteilung), also genau dort, wo bei der Faltung des Proteins die *trans*→*cis*-Isomerisierung erfolgen muss. In diesem Zusammenhang interessierte nun die Frage, wie lang ein membrangebundenes Peptid sein muss, um vom Trigger-Faktor erkannt zu werden, und ob die Gegenwart von Prolin39 für die Bindung der „T1-Peptide“ notwendig ist. Aus diesem Grund waren auf der in dieser Arbeit verwendeten Peptidmembran neben den Lactalbumin-Fragmenten auch Peptide mit Sequenzausschnitten aus Ribonuklease T1 aufgetragen. Diese waren 5 - 13 Reste lang und deckten den Sequenzbereich zwischen His27 und Ser51 ab. In einigen von ihnen war Pro39 durch Gly, Val, Ala oder D-Pro ersetzt.

Die Peptidmembran wurde mehrfach gewässert und schließlich für 1 h in TBS-Puffer eingelegt. Anschließend wurde auf jeden Peptidfleck je 1 μ l 50 μ M Trigger-Faktor in TBS-Puffer aufgetragen und über Nacht über TBS-Puffer im Kühlschrank aufbewahrt. Am folgenden Tag wurde der gebundene Trigger-Faktor in einem Biometra Fast Blot B32 System auf PVDF-Membranen geblottet. Der Aufbau war: Kathode, 3 Lagen Blotting-Papier (mit Kathodenlösung getränkt), PVDF-Membran (mit Kathodenlösung), Peptidmembran (Peptidseite in Richtung Anode), PVDF-Membran (mit Anodenlösung 1), 3 Lagen Blotting-Papier (mit Anodenlösung 1), 3 Lagen Blotting-Papier (mit Anodenlösung 2), Anode.

Geblottet wurde insgesamt sechsmal mit steigender Dauer (30 min - 120 min) und steigender Stromstärke (150 mA - 200 mA), wobei die PVDF-Membranen und Blotting-Papiere zwischen jedem Blottingschritt gewechselt wurden. Die PVDF-Membranen wurden 20 min gefärbt und anschließend in Entfärbelösung geschwenkt, bis sich die einzelnen Spots abzeichneten.

Beim ersten Schritt mit niedriger Stromstärke wurden unspezifisch gebundene Trigger-Faktormoleküle abgelöst, während sich in den weiteren Schritten ein gleich bleibendes Transfermuster zeigte. Dann wurde der noch immer auf der Peptidmembran verbliebene Trigger-Faktor direkt auf der Peptidmembran durch Färben mit Amidoschwarz sichtbar gemacht.

Abschließend wurde der auf der Peptidmembran verbliebene Trigger-Faktor nach gründlichem Entfärben immunologisch nachgewiesen. Dazu wurden unspezifische Bindungsstellen durch 2 h Schwenken der Peptidmembran in 20 ml TBT-Puffer mit 0,1 g Milchpulver abgesättigt. Über Nacht wurde die Membran dann mit verdünnten polyklonalen Trigger-Faktor-Antikörpern aus Kaninchen (1:500 in Milchpulverlösung) geschwenkt. Die Membran wurde dreimal 10 min mit frischem TBT-Puffer gewaschen, 20 min mit Milchpulverlösung (s.o.) abgesättigt und schließlich mit 20 ml Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase-Konjugat aus Ziege (1:1.000 verdünnt in Milchpulverlösung) versetzt und 90 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit 20 ml TBT-Puffer folgte die Visualisierung durch Zugabe von 20 ml Peroxidase-Testlösung.

2.9.3. Analytische Ultrazentrifugation zur Selbstassoziation von Trigger-Faktor

Um die Tendenz des Trigger-Faktors zur Selbstassoziation zu bestimmen, wurde TF W151F sowie der für Ribosomenbindungsstudien (vgl. Abschnitt 3.1.7.) benutzte fluoreszenzmarkierte BADAN-TF R14C mittels analytischer Ultrazentrifugation auf eine mögliche Oligomerisierung hin getestet. Diese Messungen wurden von H. Lilie am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle durchgeführt.

Die Sedimentations-Gleichgewichtsanalysen wurden mit Proteinkonzentrationen zwischen 10 µg/ml und 1000 µg/ml in 100 mM Tris/HCl pH^{20°C} 8,0 bei 20°C in einer Beckman XL-A Zentrifuge bei 15.000 rpm im AN50Ti-Rotor mit Sechs-Kanal-Zellen durchgeführt. Detektiert wurde die Absorption bei 230 nm (für Proteinkonzentrationen < 300 µg/ml) und bei 280 nm (> 300 µg/ml). Die apparenten Werte der molaren Masse wurden mittels der Software von Beckman Instruments unter Annahme eines partiellen spezifischen Volumens des Trigger-Faktors von 0,73 ml/g berechnet und gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen.

2.9.4. Ribosomenbindung des Trigger-Faktors

Messpuffer: 10 mM MgCl₂, 6 mM β-Mercaptoethanol, 20 mM Tris/HCl pH^{20°C} 8,0

Sämtliche Messungen zur Ribosomenbindung des Trigger-Faktors wurden in einem Hitachi F-4010 Spektrofluorimeter in thermostatierten verspiegelten Halbmikro-Fluoreszenzrührküvetten in einem Gesamtvolumen von 900 µl aufgenommen. Beobachtet wurde die Änderung der BADAN-Fluoreszenz bei 507 nm (Bandbreite 20 nm, Dämpfung 0,5 s) nach Anregung bei 398 nm (Bandbreite 1,5 nm) in Messpuffer bei 20°C.

2.9.4.1. Assoziation von BADAN-Trigger-Faktor und Ribosomen

Gemessen wurde der Fluoreszenzverlauf nach Handmischung der BADAN-markierten Trigger-Faktorvariante R14C (BADAN-TF R14C) mit Ribosomen. Dazu wurden 0,5 – 20 µM (Endkonzentration) BADAN-TF R14C in Messpuffer in der Fluoreszenzküvette vortemperiert. Gestartet wurde die Assoziation durch Zugabe von 40 µl einer 45 µM Ribosomenstammlösung, so dass die Endkonzentration jeweils 2 µM 70S-Ribosomen betrug. Der Fluoreszenzverlauf wurde durch eine monoexponentielle Kurve angeglichen.

Für eine quantitative Auswertung wurden die aus dem Kurvenangleich erhaltene Fluoreszenzamplitude und die apparente Rate gegen die Konzentration an BADAN-Trigger-Faktor aufgetragen. Da die apparente Amplitude bei hohen Trigger-Faktorkonzentrationen wieder abnahm, wurde eine Amplitudenkorrektur für den einsetzenden *Inner-Filter*-Effekt durchgeführt: Dazu wurde die Fluoreszenz von BADAN-TF R14C in Abwesenheit von Ribosomen als Funktion der Proteinkonzentration bestimmt. Unterhalb von 10 µM nahm die Fluoreszenz proportional zur Proteinkonzentration zu, darüber wick sie deutlich von der Linearität ab. Der Faktor dieser Abweichung wurde verwendet, um die Amplitudenwerte der Ribosomenassoziation zu korrigieren. Durch Angleich einer hyperbolischen Bindungskurve an die korrigierten Amplitudenwerte lässt sich die Dissoziationskonstante für den Komplex zwischen markiertem Trigger-Faktor und Ribosom errechnen.

Aus einem linearen Angleich an die apparente Rate der Assoziationsreaktion lassen sich gemäß Formel 2-13 die Ratenkonstanten für die Assoziation (k_{on}) und die Dissoziation (k_{off}) des Ribosomen-Trigger-Faktor-Komplexes ermitteln.

$$k_{\text{app}} = k_{\text{off}} + k_{\text{on}} \cdot [\text{BADAN-TF}] \quad (2-13)$$

Zur Kontrolle wurde auch die Mischung von 70S-Ribosomen mit fluoreszenzmarkiertem Trigger-Faktor R14C FRK/AAA (BADAN-TF R14C FRK/AAA) untersucht. Bei dieser Variante ist das Ribosomenbindungsmotiv des Trigger-Faktors durch Austausch der Aminosäuren Phe44, Arg45 und Lys46 gegen dreimal Ala inaktiviert. Erwartungsgemäß zeigte sich bei dieser Kontrolle keine Fluoreszenzänderung und somit keine Ribosomenbindung der Variante BADAN-TF R14C/AAA.

2.9.4.2. Dissoziation des Trigger-Faktor-Ribosomen-Komplexes

Zur Messung der Dissoziation des Trigger-Faktor-Ribosomen-Komplexes wurde zunächst der Komplex vorgebildet durch gemeinsame Inkubation von je 10 μM BADAN-TF R14C und 70S-Ribosomen für mindestens 30 min bei 20°C in Messpuffer. Die Dissoziation wurde initiiert durch 50 – 200-fache Verdünnung in die Fluoreszenzküvette auf Endkonzentrationen von je 200 nM, 100 nM oder 50 nM BADAN-TF R14C und 70S-Ribosomen in Messpuffer. Der Fluoreszenzverlauf wurde durch monoexponentielle Kurven angeglichen.

Zur Kontrolle wurde der Fluoreszenzverlauf nach gleichartiger Verdünnung von BADAN-TF R14C in Abwesenheit von Ribosomen gemessen. Erwartungsgemäß zeigte sich hier keine Fluoreszenzänderung.

2.9.4.3. Verdrängung von BADAN-Trigger-Faktor aus dem Ribosomen-Komplex

Zur Messung der Verdrängung von fluoreszenzmarkiertem Trigger-Faktor aus dem Komplex mit dem Ribosom durch unmarkierten Trigger-Faktor wurde zunächst der Komplex vorgebildet durch gemeinsame Inkubation von je 2 μM BADAN-TF R14C und 70S-Ribosomen für mindestens 30 min bei 20°C in der Messküvette.

Die Verdrängung wurde initiiert durch Zugabe von 60 μl 15-fach konzentrierter Stammlösungen von unmarkiertem Trigger-Faktor auf Endkonzentrationen von 0 – 20 μM . Die Verdrängung wurde jeweils durch gleiche Volumina gestartet, um die Komplexdissoziation durch den Verdünnungseffekt für alle Einzelmessungen konstant zu halten. Tatsächlich zeigte sich bei Zugabe von 60 μl protein-freiem Puffer eine Fluoreszenzänderung von ca. 1%, ebenso wie bei der Kontrolle durch Zugabe von 60 μl nicht-ribosomenbindendem, unmarkiertem TF FRK/AAA.

Die Fluoreszenzverläufe der Verdrängungsreaktionen wurden durch monoexponentielle Kurven angeglichen, die daraus resultierenden Amplituden und apparenten Raten gegen die Konzentration an unmarkiertem Trigger-Faktor aufgetragen. Auch hier erreichten die Amplituden ein Maximum und sanken bei hohen Konzentrationen wieder. Grund dafür ist hier nicht ein *Inner-Filter*-Effekt, da unmarkierter Trigger-Faktor nur schwach absorbiert, sondern eine Fluoreszenzabnahme des BADAN-TF R14C bei einer parallelen Konkurrenzreaktion, der Dimerisierung mit unmarkiertem Trigger-Faktor. Daher wurde zur Korrektur in Abwesenheit von Ribosomen die Fluoreszenz von 2 μM BADAN-TF R14C in Gegenwart von 0 – 20 μM unmarkiertem Trigger-Faktor bestimmt. Die relative Abnahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration an unmarkiertem Trigger-Faktor wurde zur Korrektur der Amplitudenwerte der Verdrängungsreaktion verwendet.

Aus diesen korrigierten Werten für die Fluoreszenzamplitude wurde mittels eines Berechnungsmodells für kompetitive Bindung (Thrall *et al.* 1996) die Dissoziationskonstante für den Komplex aus unmarkiertem Trigger-Faktor und 70S-Ribosomen bestimmt.

2.9.4.4. Trigger-Faktor mit Fluoreszenzmarkierung an Position 30

Analog zu den Ribosomenbindungsmessungen mit BADAN-TF R14C wurden die Messungen zur Assoziation und zur Verdrängung auch mit der fluoreszenzmarkierten Trigger-Faktorvariante BADAN-TF S30C im F-4010 Spektrofluorimeter durchgeführt, jedoch nicht wie oben erläutert mit quantitativer Auswertung, sondern lediglich qualitativ.

Da die Reaktionen dieser Variante schneller zu verlaufen schienen als die der Variante BADAN-TF R14C, wurden die Assoziations- und die Verdrängungsmessungen mit BADAN-TF S30C zusätzlich im DX 17MV *Sequential Stopped-flow* Spektrofluorimeter durchgeführt. Dazu wurden zum Reaktionsstart Lösungen jeweils im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Startlösungen waren so eingestellt, dass sich nach Mischung identische Konzentrationsverhältnisse ergaben wie bei den Messungen mit Handmischung. Die Anregung erfolgte bei 398 nm und einer Bandbreite von 1,1 nm. Zur Absorption von Streulicht und Fluoreszenzlicht unterhalb 450 nm diente eine 5 mm-Küvette mit para-Nitroanilin in Ethanol vor dem Photomultiplier. Somit wurde als Messsignal die integrale Fluoreszenz oberhalb ca. 460 nm aufgezeichnet. Die Daten wurden analog ausgewertet wie diejenigen aus Handmischungsexperimenten.

2.10. Chaperontest: Chemisch induzierte Aggregation von Citratsynthase

Experimente zu Chaperoneigenschaften verschiedener Prolylisomerasen wurden mit chemisch denaturierter Citratsynthase durchgeführt. Diese tendiert nach Sprung in Rückfaltungsbedingungen stark zur Aggregation, welche durch Chaperone unterdrückt werden kann (Buchner *et al.* 1998).

15 μM Citratsynthase aus Schweineherz wurden in 6 M GdmCl, 20 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH^{25°C} 7,7 bei Raumtemperatur eine Stunde entfaltet. Die Rückfaltung bzw. Aggregation wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung des Proteins auf 0,15 μM (Monomer) in 60 mM GdmCl, 0,2 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,7 bei 25 °C in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an PPIasen. Die Aggregation des Proteins wurde in Halbmikro-Fluoreszenzrührküvetten an einem F-4010 Hitachi Fluoreszenzspektrometer über die Zunahme der Streulichtintensität bei 360 nm (Bandbreite der Anregung 1.5 nm; Bandbreite der Emission 3.0 nm) verfolgt. Die Streulichtintensität wurde im Abstand von 30 Sekunden jeweils 5 Sekunden lang mit einer Dämpfung von 0.5 s gemessen, gemittelt und gegen die Zeit aufgetragen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Der Trigger-Faktor

Zur Untersuchung von Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen (PPIasen) als Faltungshelfer ist man auf geeignete Testsubstrate angewiesen. Als nahezu ideales Modellprotein hat sich hier die reduzierte und carboxymethylierte Form der S54G/P55N-Variante von Ribonuklease T1 (RCM-T1) herausgestellt. Die Geschwindigkeit ihrer Rückfaltung ist durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung der Tyr38-Pro39-Peptidbindung limitiert (Kiefhaber *et al.* 1990a; Mayr *et al.* 1996). Rück- und Entfaltung von RCM-T1 lassen sich einfach durch Variation der Salzkonzentration induzieren und mittels einer großen Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz sehr gut verfolgen. Der Einsatz extremer Temperatursprünge oder der Zusatz chaotroper Substanzen wie Harnstoff oder GdmCl ist dabei nicht erforderlich. Mit diesem RCM-T1-Testsystem wurden zahlreiche Prolylisomerasen charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass der Trigger-Faktor die Rückfaltung von RCM-T1 besser katalysiert als jede andere bis dahin untersuchte natürliche Prolylisomerase. Als Beispiel ist in Abbildung 3-1 die Beschleunigung der Rückfaltung von 0,2 μM RCM-T1 durch 30 nM Trigger-Faktor gezeigt (oberste Kurve).

Die Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ für die katalytische Effizienz der Trigger-Faktoren aus *E. coli* und *Mycoplasma genitalium* liegt in diesem Testsystem bei ca. $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Stoller *et al.* 1995; Scholz *et al.* 1997b; Zarnt *et al.* 1997). Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Varian-

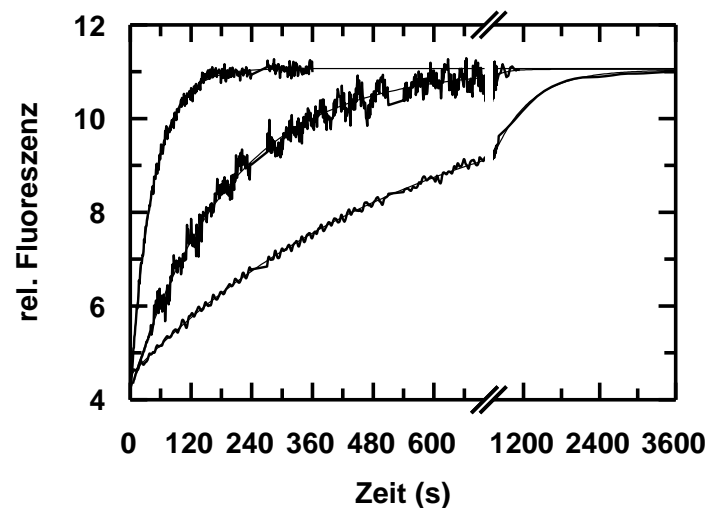


Abb. 3-1: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch Trigger-Faktor und Inhibition des Trigger-Faktors durch RCM-LA. Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von 0,2 μM RCM-T1 in Abwesenheit (untere Kurve) und Gegenwart von 30 nM TF (obere und mittlere Kurve). Bei der mittleren Kurve wurde TF durch Zugabe von 3,0 μM RCM-LA kompetitiv inhibiert. Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. RCM-T1 wurde bei 15°C in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 0,2 μM RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven). Die starke Streuung bei der mittleren Kurve resultiert aus der hohen Hintergrundfluoreszenz, die vom RCM-LA verursacht wird.

ten des Trigger-Faktors basieren - soweit nicht anders angegeben - auf dem Trigger-Faktor-Wildtypprotein aus *E. coli* und besaßen eine katalytische Effizienz im Bereich zwischen $8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $1,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Der Grund für die hohe katalytische Effizienz des Trigger-Faktors liegt in seiner - verglichen mit anderen Prolylisomerasen - hohen Substrataffinität. Diese drückt sich in einer niedrigen Michaeliskonstanten K_M von ca. $1 \text{ } \mu\text{M}$ für das Substratprotein RCM-T1 und in einer starken kompetitiven Inhibition durch permanent entfaltete Substratproteine aus (Abb. 3-1, mittlere Kurve).

3.1.1. Substratbindung und -freisetzung des Trigger-Faktors sind schnelle Reaktionen

Eine hohe Substrataffinität wirkt sich positiv auf die katalytische Effizienz aus, allerdings nur dann, wenn sie nicht zu einer lang andauernden Komplexbildung zwischen Enzym und Substrat führt. Solch eine statische "Haltefunktion", wie sie viele Chaperone - beispielsweise DnaK - zeigen, würde die Funktion von Trigger-Faktor als Faltungshelfer enorm schwächen, weil sie einerseits die Faltung von Molekülen mit korrekten Prolylisomeren durch dauerhafte Bindung verzögern und andererseits den Trigger-Faktor unnötig lange blockieren würde. Für eine optimale Katalyse prolinlimitierter Faltung sollte daher besonders die Abdissoziation vom Trigger-Faktor ein sehr schneller Vorgang sein.

3.1.1.1. Komplexbildung zwischen RCM- α -Lactalbumin und Trigger-Faktor

Die reduzierte und carboxymethylierte Form von α -Lactalbumin (RCM-La) ist in wässriger Lösung permanent entfaltet und wird daher häufig zur Untersuchung von Chaperonen verwendet. RCM-La bindet mit hoher Affinität an Trigger-Faktor und inhibiert kompetitiv dessen katalytische Funktion im RCM-T1-Rückfaltungstest (Abb. 3-1). Die Inhibitionskonstanten K_i liegen bei 50 nM für Trigger-Faktor aus *Mycoplasma genitalium* und 400 nM für Trigger-Faktor aus *E. coli* (Scholz *et al.* 1997b).

Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass sich RCM-La zur Messung der Substratbindung und -freisetzung des Trigger-Faktors eignet. Bei Mischung äquimolarer Mengen von Trigger-Faktor und RCM-La erhöht sich die Tryptophanfluoreszenz der Lösung im Vergleich zur Summe der Fluoreszenzbeiträge der einzelnen Komponenten um etwa 10 %. Diese Fluoreszenzänderung läuft innerhalb der Totzeit von Handmischungsexperimenten (ca. 3 s) vollständig ab, so dass die weiteren kinetischen Messungen in einem Stopped-Flow-Fluorimeter durchgeführt wurden. Der für Fluoreszenzmessungen verwendbare Konzentrationsbereich dieses Systems ist stark eingeschränkt, da bei Proteinkonzentrationen oberhalb $5 \text{ } \mu\text{M}$ das Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgrund der relativ geringen Fluoreszenzänderung zu schlecht wird.

RCM-La enthält drei Tryptophane, Trigger-Faktor nur ein einziges (Trp151). Um festzustellen, ob die Fluoreszenzzunahme bei Komplexbildung von Fluoreszenzänderungen des Trigger-Faktors oder des Substrats herrührt, wurde eine tryptophanfreie Variante von Trigger-Faktor (TF W151F) hergestellt. Diese Variante gleicht dem Wildtyp in allen katalytischen Eigenschaften.

So beschleunigt die verwendete Variante TF W151F die Rückfaltung von RCM-T1 mit einer katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von $1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, und die Inhibitionskonstante K_i für seine Inhibition durch RCM-La liegt ähnlich wie beim Wildtyp bei $0,44 \text{ } \mu\text{M}$ (Abb. 3-2). Im

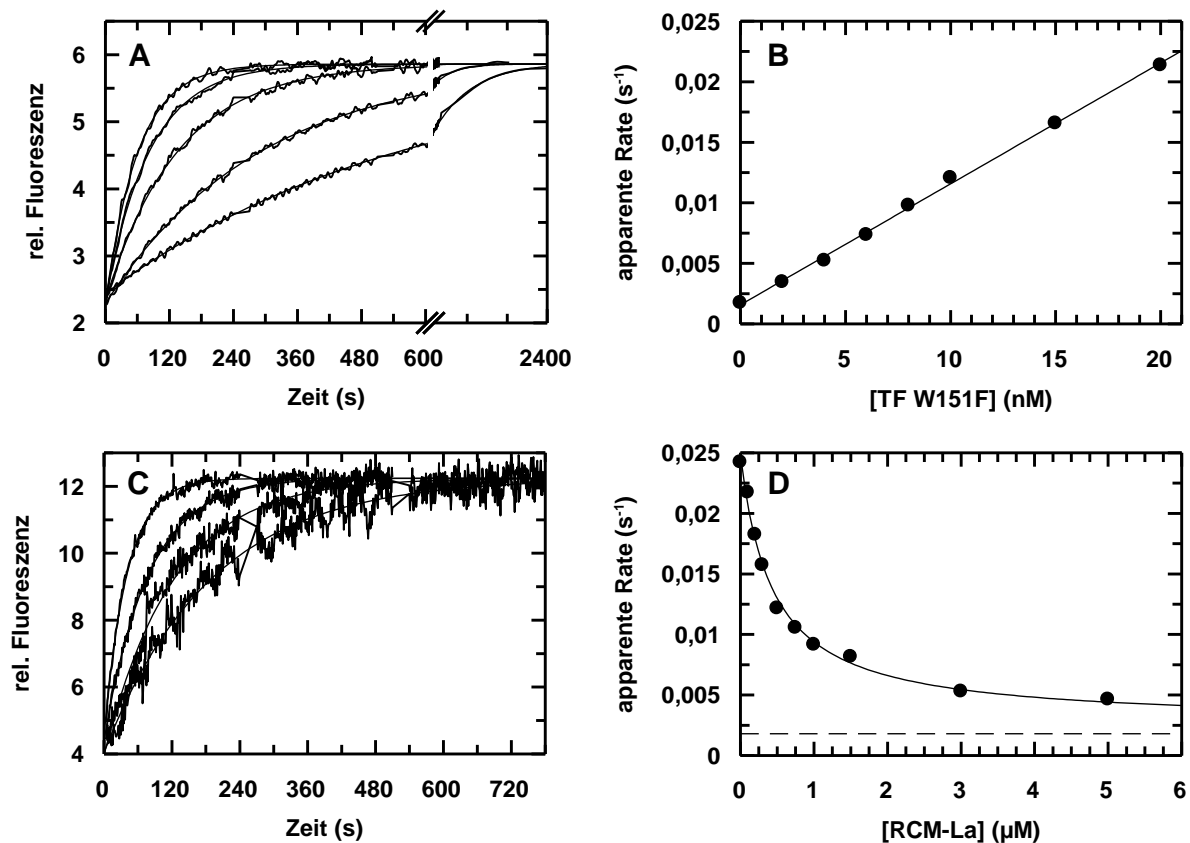


Abb. 3-2: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch TF W151F und Inhibition von TF W151F durch RCM-La. (A) Katalyse: Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von $0,1 \text{ } \mu\text{M}$ RCM-T1 in Abwesenheit (unterste Kurve) und Gegenwart von 2, 6, 10 und 15 nM TF W151F (von unten nach oben). An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven). **(B)** Abhängigkeit der apparenten Raten der Rückfaltung von RCM-T1 von der W151F-Trigger-Faktor-Konzentration. Aus der Steigung der Regressionsgeraden resultiert eine Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M von $1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die katalytische Effizienz des W151F-Trigger-Faktors. **(C) Inhibition:** Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von $0,2 \text{ } \mu\text{M}$ RCM-T1, katalysiert durch 30 nM TF W151F in Abwesenheit (oberste Kurve) und Gegenwart von $0,5$, $1,5$ und $3,0 \text{ } \mu\text{M}$ RCM-La (von oben nach unten). An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven). **(D)** Abhängigkeit der apparenten Raten der katalysierten Rückfaltung von RCM-T1 von der RCM-La-Konzentration. Der Angleich einer Bindungskurve an die Datenpunkte (durchgezogene Linie) ergibt einen apparenten K_i -Wert von $0,44 \text{ } \mu\text{M}$ für die kompetitive Inhibition von TF W151F durch RCM-La. Die gestrichelte Linie zeigt die Rate der unkatalysierten Rückfaltung ($0,00175 \text{ s}^{-1}$). RCM-T1 wurde jeweils bei 15°C in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf $0,1 \text{ } \mu\text{M}$ (A) bzw. $0,2 \text{ } \mu\text{M}$ (C) RCM-T1 in $2,0 \text{ M}$ NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet.

Gegensatz zu diesem emittiert TF W151F allerdings keine Tryptophanfluoreszenz (Abb. 3-3, blaue Kurve), was Fluoreszenzmessungen auch bei hohen Überschüssen an Trigger-Faktor ohne deutliche Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ermöglicht.

Bei der Mischung von 1 μM RCM-La mit 1 μM TF W151F zeigt sich ebenfalls eine schwache Zunahme der Tryptophanfluoreszenz im Vergleich zur Summe der Einzelspektren (Abb. 3-3), wobei das Differenzspektrum dem aus der Mischung mit Wildtyp-Trigger-Faktor gewonnenen Differenzspektrum (Daten nicht gezeigt) sehr ähnlich ist. Die Fluoreszenzzunahme bei der Komplexbildung ist also tatsächlich auf Änderungen in der Umgebung der Tryptophanreste des gebundenen RCM-La zurückzuführen.

Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich qualitativ zeigen, dass man die Fluoreszenzänderung bei Bildung und Auflösung des Komplexes aus RCM-La und TF W151F im Stopped-Flow-Fluorimeter beobachten kann und dass diese Reaktion im Millisekundenbereich abläuft.

Die Assoziationskinetiken von 1 μM RCM-La mit 0,2 bis 20 μM TF W151F sind in Abbildung 3-4 A gezeigt. Kontrolllexperimente ergaben, dass sich weder bei der Mischung von RCM-La (Abb. 3-4 A, unterste Kurve) noch von TF W151F (Daten nicht gezeigt) mit Puffer die Fluoreszenz ändert. Die beobachtete Fluoreszenzzunahme bei der Mischung von RCM-La und TF W151F ist also tatsächlich auf die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinkomponenten zurückzuführen. Die Bindung erfolgt sehr schnell, in Gegenwart von 10 μM TF W151F beispielsweise mit einer Halbwertszeit von 12 ms.

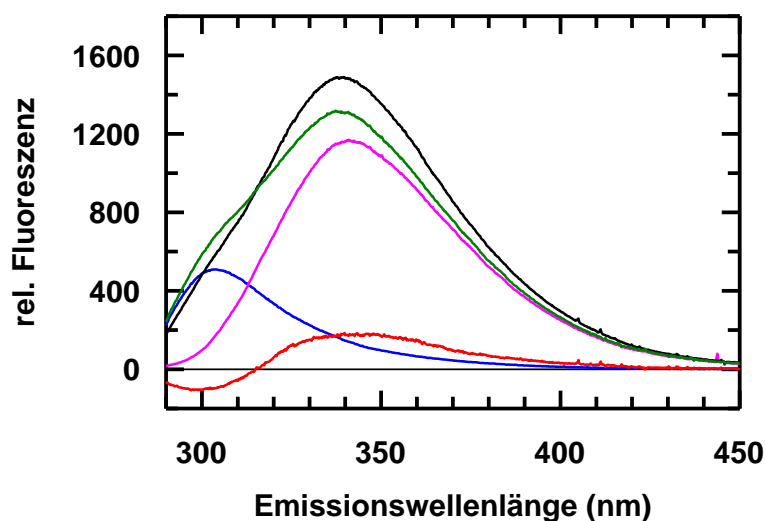


Abb. 3-3: Änderung der Fluoreszenz von RCM-La durch Bindung an TF W151F. Pufferkorrigierte Fluoreszenzspektren von 1 μM RCM-La (—), 1 μM TF W151F (—) und von einer Mischung aus 1 μM RCM-La und 1 μM TF W151F (—). Aus den beiden Einzelspektren von RCM-La und TF W151F wurde das Summenspektrum errechnet (—), welches sich klar vom Spektrum der Mischung unterscheidet. Das Differenzspektrum zwischen beiden ist rot (—) eingezeichnet. Die Messungen erfolgten in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C in verspiegelten Halbmikro-Fluoreszenzrührküvetten nach Anregung bei 280 nm.

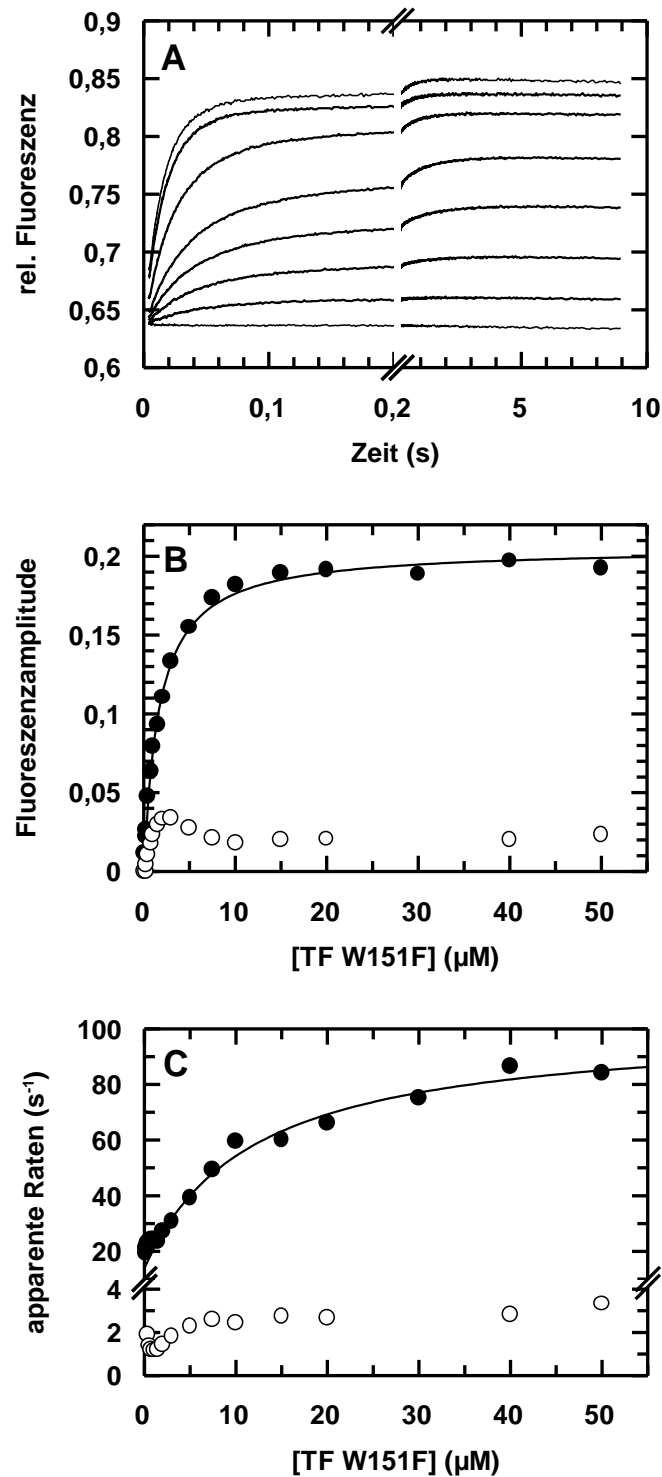


Abb. 3-4: Kinetik der Assoziation von RCM-La mit TF W151F. (A) Zunahme der integralen Fluoreszenz oberhalb von 330 nm bei Assoziation von 1 μM RCM-La mit (von unten nach oben) 0, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 und 20 μM TF W151F. Die Assoziation wurde initiiert durch Stopped-Flow-Mischung gleicher Volumina an RCM-La- und TF W151F-Lösungen in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C. An die Fluoreszenzverläufe wurden doppel-exponentielle Kurven angeglichen. Um den geringen Fluoreszenzbeitrag von TF W151F zu korrigieren, wurden alle Kurven auf den gleichen Startwert normiert. (B) Abhängigkeit der Amplituden der schnellen (●) und der langsamen (○) Phase der Assoziation von der Trigger-Faktor-Konzentration. Der Angleich einer Bindungskurve an die Datenpunkte (durchgezogene Linie) ergibt einen apparenten K_D -Wert von 1,7 μM . (C) Abhängigkeit der apparenten Raten der schnellen (●) und der langsamen (○) Phase der Assoziation von der Trigger-Faktor-Konzentration. Die durchgezogene Linie entspricht einer Datenanalyse für einen Zweischritt-Bindungsmechanismus (Gleichung 3-2). Daraus ergibt sich ein apparenter K_D -Wert von 1,85 μM . Datenpunkte im substöchiometrischen Bereich (0,1 - 1 μM TF W151F) wurden für die Analyse nicht berücksichtigt.

Die einzelnen Kurven in Abbildung 3-4 A können am besten als Summe von zwei Exponentialfunktionen angeglichen werden. Die Amplitude der schnelleren Phase, welche etwa 90 % der gesamten Fluoreszenzänderung ausmacht, nimmt - wie für eine Assoziationsreaktion zu erwarten - mit steigender Trigger-Faktor-Konzentration zu (Abb. 3-4 B). Der Angleich einer hyperbolischen Bindungskurve an diese Amplituden ergibt eine apparente Dissoziationskonstante $K_D(\text{app})$ von 1,7 μM für den Komplex zwischen RCM-La und TF W151F.

Die ermittelte Rate für die schnelle Reaktionsphase nimmt ebenfalls nahezu hyperbolisch zu. Dies ist untypisch für eine „einfache“ Assoziationsreaktion und kann am besten durch ein zweistufiges Bindungsmodell beschrieben werden (Schema 3-1), bei dem der schnellen Bildung eines initialen Kollisionskomplexes eine strukturelle Umlagerung folgt, welche zur beobachteten Fluoreszenzänderung führt.



Schema 3-1: Zweistufiges Modell für die Komplexbildung von RCM-La und Trigger-Faktor. LA bezeichnet die freie Form von RCM-La, TF die freie Form von Trigger-Faktor, LA·TF den initialen Komplex aus beiden und LA·TF* den sekundären Komplex, dessen Bildung die beobachtete Fluoreszenzänderung bewirkt.

Für die Dissoziationskonstanten dieses Modells gilt:

$$K_D = k_{\text{off}} / k_{\text{on}} \quad (3-1 \text{ a})$$

$$K_{\text{iso}} = k_{-2} / k_{+2} \quad (3-1 \text{ b})$$

$$K_D(\text{app}) = K_D \cdot K_{\text{iso}} = (k_{\text{off}} \cdot k_{-2}) / (k_{\text{on}} \cdot k_{+2}) \quad (3-1 \text{ c})$$

Erfolgt die Gleichgewichtseinstellung des ersten Schrittes schnell im Vergleich zum zweiten Schritt, so gilt für die apparenten Raten k_{app} der Gleichgewichtseinstellung (Bagshaw *et al.* 1974; John *et al.* 1990):

$$k_{\text{app}} = k_{-2} + \frac{k_{+2} \cdot [\text{TF}]}{K_D + [\text{TF}]} \quad (3-2)$$

Ein Angleich einer hyperbolischen Kurve an die Messpunkte bei Überschuss an Trigger-Faktor nach Gleichung 3-2 ergibt für den ersten Bindungsschritt eine Dissoziationskonstante K_D von 11,8 μM , sowie für den zweiten Schritt Ratenkonstanten von $k_{+2} = 88 \text{ s}^{-1}$ und $k_{-2} = 13,8 \text{ s}^{-1}$ und somit $K_{\text{iso}} = 0,16$. Daraus errechnet sich eine apparente Dissoziationskonstante $K_D(\text{app})$ von 1,85 μM , welche sehr gut mit dem $K_D(\text{app})$ -Wert von 1,7 μM aus der Amplitudenanalyse (Abb. 3-4 B) übereinstimmt und zumindest in der gleichen Größenordnung liegt wie der K_i -Wert von 0,4 μM , der aus der Messung der Inhibition von Trigger-Faktor durch RCM-La im RCM-T1-Rückfaltungstest erhalten worden war (Scholz *et al.* 1997b). Eine mögliche Erklärung für die Abweichung der Werte aus Bindungs- und Inhibitionsstudien ist, dass RCM-La mehrere potentielle Bindungsstellen für Trigger-Faktor besitzt (vgl. Abschnitt 3.1.2.).

Vermutlich führt die Bindung an jede beliebige dieser Stellen zu einer Inhibition des Trigger-Faktors, so dass bei den Inhibitionsmessungen die Affinität zur „stärksten“ Bindungsstelle ermittelt wird. Im Gegensatz dazu liefert möglicherweise nur die Bindung an eine bestimmte dieser Stellen ein Fluoreszenzsignal. Somit ließe sich bei den Stopped-Flow-Bindungsstudien nur der K_D -Wert für diese ganz bestimmte Bindungsstelle (mit möglicherweise niedrigerer Affinität zum Trigger-Faktor) ermitteln.

Die Herkunft der langsamen Phase, welche nur ca. 10% der gesamten Fluoreszenzamplitude beisteuert, bleibt unklar. Möglicherweise stammt sie von einer Heterogenität im entfalteten Substratprotein - beispielsweise aufgrund einer unvollständigen Reduktion und Carboxymethylierung der Cysteinreste - oder von alternativen Möglichkeiten zur Bindung an den Trigger-Faktor. Außerdem neigt der Trigger-Faktor zur Selbstassoziation (vgl. Abschnitt 3.1.4.) und spätere Ergebnisse anderer Gruppen deuten darauf hin, dass Trigger-Faktor nur als Monomer an Proteinsubstrate und auch an Ribosomen binden kann. Kaiser *et al.* konnten mit Hilfe des Försterresonanzenergietransfers (FRET) markierter Trigger-Faktor-Protomere zeigen, dass die Monomerisierung der TF-Dimere mit einer Halbwertszeit von ca. 1 Sekunde erfolgt (Kaiser *et al.* 2006). Dieses Zeitfenster entspricht in etwa dem der langsamen Phase der Assoziation zwischen RCM-La und TF. Es ist daher gut möglich, dass die schnelle Phase die Assoziation zwischen bereits im Reaktionsansatz vorliegenden Trigger-Faktor-Monomeren und RCM-La darstellt, während die langsame Phase durch diejenigen Trigger-Faktor-Monomere bewirkt wird, die erst langsam durch Dissoziation von Trigger-Faktor-Dimeren „nachgeliefert“ werden.

3.1.1.2. Dissoziation des Komplexes zwischen RCM- α -Lactalbumin und Trigger-Faktor

Wie bereits weiter oben erläutert, spielt die Lebensdauer des Trigger-Faktor-Substrat-Komplexes eine wichtige Rolle für die Effizienz der Faltungskatalyse. Eine Verdünnung dieses Enzym-Substrat-Komplexes sollte dessen Dissoziation bewirken, vorausgesetzt der Konzentrationssprung findet bei partieller Bildung des Komplexes, also im Bereich seiner Dissoziationskonstante statt. Abbildung 3-5 zeigt die Fluoreszenzänderung nach 11-facher Verdünnung eines vorgebildeten Komplexes aus RCM-La und TF W151F auf Endkonzentrationen von jeweils 100 nM. Tatsächlich zeigt die beobachtete Fluoreszenzabnahme eine Verschiebung des Komplexgleichgewichts zu den dissoziierten Komponenten. Diese Dissoziation ist ebenfalls sehr schnell und läuft mit einer Halbwertszeit von ca. 120 ms ab. Man kann daher mit ziemlicher Sicherheit ausschließen, dass die Abdissoziation des umgesetzten Substrats vom Trigger-Faktor der limitierende Faktor für den ungewöhnlich niedrigen k_{cat} -Wert des Trigger-Faktors von $1,3 \text{ s}^{-1}$ (Scholz *et al.* 1997b) ist.

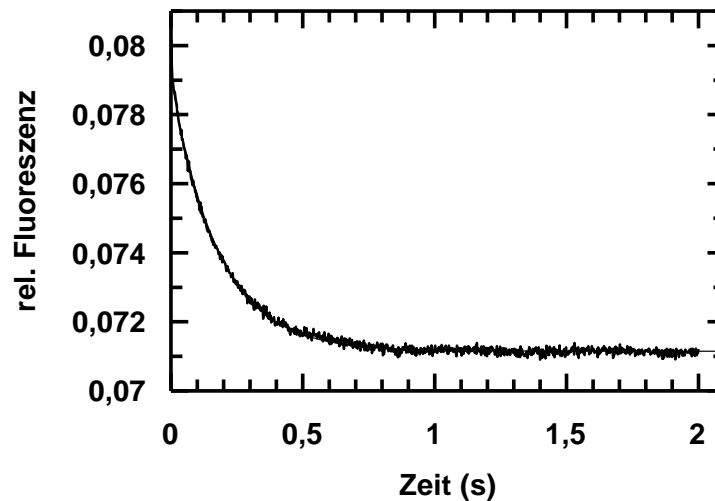


Abb. 3-5: Kinetik der Dissoziation des Komplexes aus RCM-La und TF W151F. Die Dissoziation wurde durch 11-fache Stopped-Flow-Verdünnung einer vorinkubierten Mischung aus RCM-La und TF W151F auf Endkonzentrationen von jeweils 100 nM in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C induziert und über die Abnahme der integralen Fluoreszenz oberhalb von 330 nm beobachtet. Der Angleich einer monoexponentiellen Funktion an die Daten (glatte Kurve) ergibt eine Halbwertszeit des Komplexes von 120 ms.

3.1.1.3. Komplexbildung zwischen RCM-(P39A)-T1 und Trigger-Faktor

Vergleichbare Resultate wie mit RCM-La lassen sich auch mit der reduzierten und carboxymethylierten Form der P39A-Ribonuklease T1 (RCM-P39A-T1) als Bindungssubstrat erhalten. In dieser Variante ist das *cis*-Prolin39 durch Alanin ersetzt. Allerdings stellte sich heraus, dass die resultierende Bindung Tyr38-Ala39 im gefalteten Protein wie beim Wildtypprotein in *cis* vorliegt. Durch diese energetisch ungünstige nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindung wird der gefaltete Zustand stark destabilisiert (Mayr *et al.* 1994). Entfernt man durch Reduktion auch noch die stabilisierenden Disulfidbrücken, so kann sich die native Struktur auch bei hohen Salzkonzentrationen nicht mehr ausbilden. Daher bleibt RCM-P39A-T1 im Gegensatz zu RCM-T1 unabhängig von der Salzkonzentration permanent entfaltet und inhibiert die Aktivität des Trigger-Faktors kompetitiv mit einer ähnlichen Inhibitionskonstante K_i wie RCM-La (Scholz *et al.* 1998).

Wie bei der Komplexbildung zwischen TF W151F und RCM-La erhöht sich die Fluoreszenz des Proteinsubstrats bei Bindung von RCM-P39A-T1 an den Trigger-Faktor. Auch hier lassen sich die Komplexbildung und -dissoziation im Stopped-Flow-Fluorimeter beobachten, wobei sich bei beiden Reaktionen eine zusätzliche langsame Phase mit geringer Amplitude im Sekundenbereich zeigt (Abb. 3-6). Sowohl die schnelle Phase der Assoziation als auch die der Dissoziation von TF und RCM-P39A-T1 laufen wie bei RCM-La im Millisekundenbereich ab und beide sind verglichen mit RCM-La sogar noch etwas schneller. Die Bindung in Gegenwart von jeweils 1 μ M TF W151F und RCM-P39A-T1 erfolgt mit einer Halbwertszeit von 5 ms, und die Dissoziation des Komplexes verläuft mit einer Halbwertszeit von 12 ms, also sogar zehnmal schneller als die Dissoziation des Komplexes aus RCM-La und TF W151F.

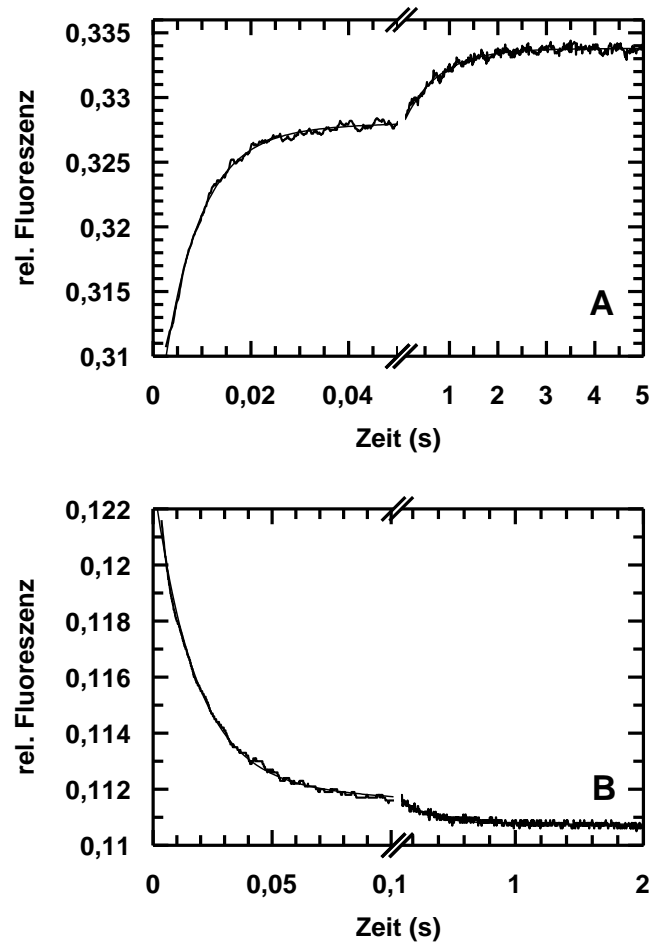


Abb. 3-6: Kinetik der Assoziation und Dissoziation von RCM-P39A-T1 und TF W151F. (A) Zunahme der integralen Fluoreszenz oberhalb von 330 nm bei Assoziation von jeweils 1 μ M RCM-P39A-T1 und TF W151F. Die Assoziation wurde initiiert durch Stopped-Flow-Mischung gleicher Volumina an RCM-P39A-T1- und TF W151F-Lösungen (B) Abnahme der integralen Fluoreszenz oberhalb von 330 nm bei Dissoziation des Komplexes aus RCM-P39A-T1 und TF W151F. Die Dissoziation wurde durch 11-fache Stopped-Flow-Verdünnung einer vorinkubierten Mischung aus RCM-P39A-T1 und TF W151F auf Endkonzentrationen von jeweils 100 nM initiiert. Beide Messungen erfolgten in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C. An die Fluoreszenzverläufe wurden jeweils doppel-exponentielle Funktionen angeglichen (glatte Kurven). Die absoluten Fluoreszenzwerte beider Messungen sind nicht vergleichbar, da diese bei verschiedenen Photomultiplier-Spannungen durchgeführt wurden.

3.1.1.4. Die Substratbindung des Trigger-Faktors ist unabhängig von Nukleotiden

Die schnelle Substratfreisetzung unterscheidet den Trigger-Faktor deutlich von den meisten „klassischen“ Chaperonen wie GroEL und DnaK. Diese binden zwar ebenfalls mit hoher Affinität entfaltete Proteinketten, benötigen zur Freisetzung ihrer Substrate jedoch häufig die Hilfe von Cochaperonen wie GroES und DnaJ sowie Energie in Form von ATP oder GTP (Genevaux *et al.* 2007; Horwich *et al.* 2007).

Für den Trigger-Faktor ist bislang kein regulatorisches Cochaperon bekannt. Auch die Zugabe von 100 μM ATP oder GTP hat keinerlei Einfluss auf seine Substratbindung (Abb. 3-7) bzw. -freisetzung (Daten nicht gezeigt). Die einzige Abhängigkeit des Trigger-Faktors von Cofaktoren, die bislang gezeigt werden konnte, betrifft den Trigger-Faktor aus *Thermus thermophilus*. Dieser benötigt für seine volle Chaperonaktivität die Gegenwart von Zinkionen (Suno *et al.* 2004).

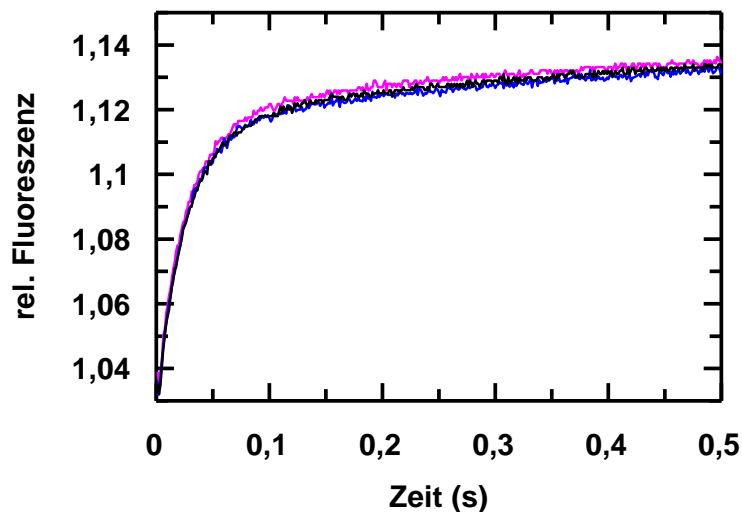


Abb. 3-7: Kinetik der Assoziation von RCM-La mit TF W151F in Abwesenheit (—) von Nukleotiden und in Gegenwart von 100 μM ATP (—) bzw. GTP (—). Die Präsenz von Nukleotiden wie ATP oder GTP hat keinen Einfluss auf die Kinetik der Komplexbildung. Um den Filtereffekt durch die Absorption der Nukleotide zu korrigieren, wurden alle Kinetiken auf den Startwert der nukleotidfreien Messung normiert. Nach dieser Normierung sind die drei Kurven nahezu deckungsgleich. Die Assoziation von RCM-La und TF wurde initiiert durch Stopped-Flow-Mischung gleicher Volumina an RCM-La- und TF W151F-Lösungen zu Endkonzentrationen von je 2,0 μM in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C.

Prinzipielle Parallelen zeigen sich hier zum Chaperon SecB. Auch dieses steht in schnellem Wechsel zwischen Bindung und Freisetzung entfalteter Proteinketten, wobei es dafür weder Cochaperone noch Energie in Form von Nukleosidtriphosphaten benötigt. Somit ähneln sich auch die grundlegenden potentiellen Wirkungsweisen beider Proteine: Bei SecB bewirkt das schnelle Gleichgewicht zwischen Bindung und Freisetzung, dass Proteine, die nicht für den Export bestimmt sind, bei einer „versehentlichen“ Bindung an SecB rasch wieder freigesetzt werden und sich durch schnelle Faltung einer erneuten Bindung an das Chaperon entziehen können. Exportproteine hingegen können aufgrund ihrer Signalsequenz nicht schnell genug falten und werden daher nach einer kurzfristigen Freisetzung immer wieder von SecB gebunden, bis das zu exportierende Protein an die nächste Komponente des Exportsystems weitergegeben wird (Topping & Randall 1997). Beim Trigger-Faktor gibt die hohe Dynamik der Komplexbildung zufällig gebundenen Proteinen, die weder Schutz durch ein Chaperon noch Katalyse durch eine Prolylisomerase benötigen, die Möglichkeit, einer unnötigen weite-

ren Wechselwirkung mit dem Trigger-Faktor durch schnelle Faltung zum nativen Zustand zu entkommen.

Da die Lebensdauer des TF-Substrat-Komplexes mit etwa 100-200 ms sehr kurz ist, kann der Trigger-Faktor außerdem neu synthetisierte Proteinketten zügig nach Prolylbindungen „absuchen“, an denen eine Isomerisierung katalysiert werden kann. Nach solch einer Katalyse gewährleistet die schnelle Dissoziation vom Trigger-Faktor, dass Moleküle mit korrekten Isomeren schnell in ihren nativen Zustand falten, während solche mit nicht-nativen Isomeren nicht weiter falten und somit für eine erneute Katalyserunde wieder an den Trigger-Faktor binden können.

Häufig trägt Trigger-Faktor durch seine Chaperonfunktion zur Verhinderung von Aggregation entfalteter Proteine (s. 3.1.3.) und zu einer Erhöhung der Ausbeute korrekt gefalteter Proteine bei (Huang *et al.* 2000; Nishihara *et al.* 2000). Bei Proteinen, die sich nicht durch schnelle Faltung der erneuten Bindung an Trigger-Faktor entziehen können, kann es jedoch durchaus vorkommen, dass sie durch die Bindung an Trigger-Faktor in ihrer Faltung oder auch im Export aus der Zelle behindert werden (Huang *et al.* 2002; Lee & Bernstein 2002; Liu *et al.* 2005). Dies zeigt sich besonders häufig in Gegenwart hoher Konzentrationen an TF oder bei der Expression komplexer eukaryontischer Proteine in Bakterienzellen (Agashe *et al.* 2004; Xie & Zhou 2008). Vor diesem Hintergrund wird klar, dass die im Vergleich zu anderen Chaperonen eher moderate Substrataffinität des Trigger-Faktors mit Dissoziationskonstanten im Bereich von 1 μM durchaus sinnvoll ist, da eine deutlich höhere Affinität tatsächlich zu einer Blockierung von Proteinfaltung durch zu starke dauerhafte Bindung an den TF führen könnte.

3.1.2. Substratspezifität des Trigger-Faktors: Bindungsstellen in RCM-La und RCM-T1

Trigger-Faktor bindet mit geringer Spezifität an eine Vielzahl entfalteter Proteinketten. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass sich innerhalb eines Proteins mehrere Bindungsstellen für den Trigger-Faktor befinden. So konnte Christian Scholz zeigen, dass die inhibitorische Wirkung von RCM-La auf Trigger-Faktor nach einem kurzen Proteasepuls mit Chymotrypsin zunimmt (Scholz 1999). Die naheliegendste Interpretation für diesen Befund ist, dass durch die proteolytische Fragmentierung von RCM-La die effektive Inhibitorkonzentration im Testansatz steigt. Dies würde voraussetzen, dass RCM-La tatsächlich mehrere Bindungsstellen für den Trigger-Faktor besitzt.

Mit Hilfe einer Peptidbibliothek sollten diese Bindungsstellen identifiziert werden. Die Bibliothek bestand aus membrangekoppelten Peptiden mit jeweils 13 Aminosäuren, die jeden möglichen 13er-Ausschnitt des α -Lactalbumins repräsentierten (Aminosäuren 1-13, 2-14, ... 130-142; die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz im Lactalbumin-Vorläuferprotein).

Gleichzeitig wurden auch Peptide mit gegenläufiger Aminosäureabfolge (AS 142-130, 141-129, ... 13-1) eingesetzt, um zu ermitteln, ob die Reihenfolge der Aminosäuren im Substrat für die Erkennung des Trigger-Faktors eine Rolle spielt.

Nach Inkubation der Bibliothek mit Trigger-Faktor wurde das anhaftende Protein von der Peptidmembran in mehreren Schritten mit steigender Stromstärke und Blottingdauer auf PVDF-Membranen elektrotransferiert und dort durch Färbung mit Amidoschwarz detektiert. Beim ersten Blottingschritt mit niedriger Stromstärke wurde Trigger-Faktor besonders von den Peptidfeldern abgelöst, an die er nur unspezifisch gebunden hatte. Bei den weiteren Schritten zeigte sich ein gleich bleibendes Transfermuster, das die Identifizierung der Peptide mit höherer Affinität zum Trigger-Faktor ermöglichte. Allerdings war die Färbereaktion so schwach, dass die Transferpunkte zwar unmittelbar nach dem Anfärben gesehen werden konnten, eine Ablichtung durch Fotografie oder Einscannen aber scheiterte. Aus diesem Grund wurde nach insgesamt sechs Blottingschritten der noch immer an die Peptide gebundene

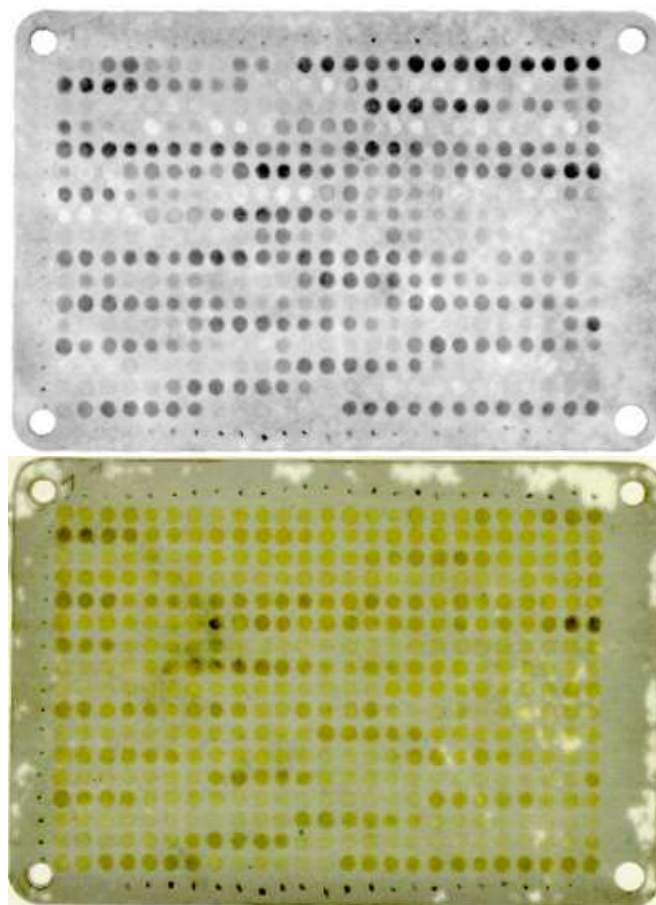


Abb. 3-8: Bindung des Trigger-Faktors an membrangebundene Peptide. Trigger-Faktor wurde mit den Peptiden inkubiert und sechsmal bei steigender Stromstärke und Transferdauer auf PVDF-Membranen elektrotransferiert. Der danach noch auf der Peptidmembran gebundene Trigger-Faktor wurde mit Amidoschwarz gefärbt (obere Teilabbildung), oder mit Hilfe von Anti-TF-IgG aus Kaninchen und Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat aus Ziege immunodetektiert (untere Teilabbildung).

Trigger-Faktor direkt auf der Peptidmembran sowohl durch Anfärben mit Amidoschwarz als auch durch Immunodetektion sichtbar gemacht (Abb. 3-8). Alle drei Detektionsmethoden lieferten sehr ähnliche Ergebnisse, wobei die Färbung mit Amidoschwarz auf der Peptidmembran einen etwas größeren Anteil Trigger-Faktor-bindender Peptide ergab als die Immunodetektion und die Färbung der PVDF-Membranen.

Insgesamt finden sich im α -Lactalbumin drei Trigger-Faktor-Bindungsgebiete. In Abbildung 3-9 sind alle Aminosäuren hervorgehoben, die in bindenden Peptiden enthalten sind. Vermutlich tragen aber nicht alle Reste innerhalb eines 13er-Peptides tatsächlich zur Bindung bei, sondern nur ein Teil davon. Die tatsächlichen Bindungsgebiete im Lactalbumin sind deshalb wahrscheinlich nicht so ausgedehnt wie in der Abbildung angedeutet.

**EQLTKCEVEFR ELKDLKGYGG VSLPEWVCTT FHTSGYDTQA
 IVQNNDSTEY GLFQINNKIW CKDDQNPHSS NICNISCDKF
 LDDDLTDDIM CVKKILDKVG INYWLAHKAL CSEKLDQWLC
 EKL**

Abb. 3-9: Trigger-Faktor-Bindungsgebiete im α -Lactalbumin. Die Sequenz des reifen α -Lactalbumins ist im Einbuchstaben-Code angegeben. Aminosäuren, die in Trigger-Faktor-bindenden Peptiden mit der korrekten Leserichtung der Lactalbuminsequenz vorkommen, sind **rot** gedruckt, solche, die in den bindenden Peptiden mit der entgegengesetzten Leserichtung vorkommen, sind unterstrichen.

Es fällt auf, dass mit den Peptiden in entgegengesetzter Leserichtung der Lactalbuminsequenz praktisch die gleichen Bindungsgebiete gefunden wurden. Die Reihenfolge der Aminosäuren innerhalb eines Sequenzabschnitts ist also für die Bindung an den Trigger-Faktor irrelevant. Lediglich die Randgebiete der Bindungsregionen sind je nach Leserichtung der Sequenz gegeneinander verschoben, d.h. in korrekter Leserichtung beginnen und enden diese Regionen eher als in der gegenläufigen Leserichtung. Offenbar werden die C-terminalen Reste der Testpeptide von Trigger-Faktor besser erkannt als die N-terminalen. Die eigentlichen Trigger-Faktor-Bindungsstellen im α -Lactalbumin wären dann also diejenigen Reste, bei denen sich die Bindungsregionen der beiden entgegengesetzten Leserichtungen überschneiden.

Die Zahl der hier getesteten Sequenzen reicht natürlich bei weitem nicht aus, um durch eine statistische Auswertung ein Bindungsmotiv für den Trigger-Faktor zu ermitteln. Allerdings fällt auf, dass die 29 hier identifizierten TF-bindenden Peptide einen durchschnittlichen theoretischen pI-Wert von 8,85 und somit überwiegend eine positive Nettoladung besitzen. Dies ist bemerkenswert, weil das der Bibliothek zugrunde liegende α -Lactalbumin einen sehr niedrigen pI-Wert von 4,80 hat und somit stark negativ geladen ist. Beispielsweise erhöht sich der Anteil an den positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin in den bindenden

Peptiden im Vergleich zum gesamten α -Lactalbumin von 0,8 auf 2,7 % bzw. von 9,8 auf 17,2 %. Positiv geladene Peptide scheinen also deutlich bevorzugt gebunden zu werden.

Anhand einer ähnlichen Peptidbibliothek hatte Gerlind Stoller (Halle) die Trigger-Faktor-Bindungsstellen der Ribonuklease T1 identifiziert. Als stärkste Bindungsregion erwies sich der Bereich um Pro39 (G. Stoller, persönliche Mitteilung), also genau dort, wo bei der Faltung des Proteins die *trans*→*cis*-Isomerisierung erfolgen muss. In diesem Zusammenhang interessierte nun die Frage, wie lang ein membrangebundenes Peptid sein muss, um vom Trigger-Faktor erkannt zu werden, und ob die Gegenwart von Pro39 für die Bindung der „T1-Peptide“ notwendig ist. Aus diesem Grund waren auf der in dieser Arbeit verwendeten Peptidmembran neben den Lactalbumin-Fragmenten auch Peptide mit Sequenzausschnitten aus Ribonuklease T1 aufgetragen. Diese waren 5 - 13 Reste lang und deckten den Sequenzbereich zwischen His27 und Ser51 ab. In einigen von ihnen war Pro39 durch Gly, Val, Ala oder D-Pro ersetzt.

Sämtliche Peptide, die einen mindestens 5 Aminosäuren langen Ausschnitt aus der Sequenz Ser37-Tyr38-Pro39-His40-Lys41-Tyr42-Asn43-Asn44-Tyr45 enthielten, wurden von Trigger-Faktor gebunden, solange jeweils das negativ geladene Glu46 nicht Bestandteil des Peptides war. Eine Gesamtlänge von 5 Resten war dabei völlig ausreichend, und auch der Austausch von Pro39 gegen die genannten anderen L- und D-Aminosäuren störte die Wechselwirkung mit Trigger-Faktor nicht. Die einzige Gemeinsamkeit aller dieser TF-bindenden Peptide der RNase T1-Sequenz war, dass sie mindestens ein Lysin enthielten. Ähnlich wie beim α -Lactalbumin begünstigt also eine positive Nettoladung die Erkennung durch Trigger-Faktor.

Die zwischenzeitlich von der Gruppe von Bernd Bukau (Heidelberg) publizierten Ergebnisse, die auf der Untersuchung der TF-Bindung an knapp 3000 verschiedene 13er-Peptide basieren (Patzelt *et al.* 2001), bestätigen die hier vorgestellten Daten. Demnach ergibt sich als ideales Bindungsmotiv eine Folge von etwa acht Aminosäuren, in der aromatische und basische Reste wie Trp, Tyr, Phe, His, Arg und Lys bevorzugt sind und in der saure Reste eher selten vorkommen. Die Position dieser Reste innerhalb des Motivs ist ebenso wie die Gegenwart von Prolinen für die Bindung an Trigger-Faktor nicht entscheidend.

Diese Substratspezifität erinnert an das DnaK-Bindungsmotiv, das aus einem fünf Aminosäuren langen hydrophoben Mittelteil, flankiert von positiven Resten, besteht (Patzelt *et al.* 2001; Deuerling *et al.* 2003). Auch hier ist innerhalb des hydrophoben Teils die genaue Abfolge der Aminosäuren unerheblich. Es wäre durchaus denkbar, dass sich eine derartige Anhäufung hydrophober und positiv geladener Reste als allgemeines Erkennungsmotiv entfalteter Proteinbereiche für verschiedene Chaperone etabliert hat.

Während Trigger-Faktor wie eine Hebamme jede neu synthetisierte Proteinkette an der Austrittsstelle des Ribosoms erwartet, bindet DnaK ungefaltete Proteinketten im Cytosol und verbraucht bei seiner Chaperonaktivität Energie in Form von ATP. Trotz dieser deutlichen

Unterschiede im Wirkmechanismus ist die ähnliche Substratspezifität nicht die einzige Verbindung zwischen Trigger-Faktor und DnaK. Obwohl beide Proteine in *E. coli* in hoher Konzentration vorliegen, ist keines von beiden für sich essentiell. Zellen mit inaktiviertem Trigger-Faktorgen *tig* zeigen keine Defekte bei Wachstum oder Proteinfaltung. Allerdings konnte gezeigt werden, dass in diesen Zellen ein deutlich größerer Anteil an neu synthetisierten Proteinen vorübergehend mit DnaK wechselwirkt als in Wildtypzellen. Schaltet man dann zusätzlich zum Trigger-Faktorgen auch noch das Gen für DnaK aus, so ist dies für *E. coli* unter normalen Wachstumsbedingungen letal (Deuerling *et al.* 1999; Teter *et al.* 1999). Trotz grundsätzlich unterschiedlicher Wirkungsweisen scheinen Trigger-Faktor und DnaK beim „Chaperoning“ entfalteter Proteine also zu kooperieren beziehungsweise sich zu ergänzen.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die synthetische Letalität eines TF-/DnaK-*Knock Outs* durch die gleichzeitige Überexpression des redoxregulierten Chaperons Hsp33 aufgehoben werden kann. Hierbei übernimmt Hsp33 allerdings nicht ersatzweise die Chaperonfunktion von Trigger-Faktor und DnaK, sondern führt bevorzugt den an der Proteinbiosynthese beteiligten Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) dem Abbau durch die Protease Lon zu. Vermutlich wird dadurch die Proteinsyntheserate der Zelle so weit verlangsamt, dass sie der verschlechterten Faltungskapazität der *tig⁻/dnak⁻*-Zelle somit wieder angepasst ist und die Zelle daher lebensfähig ist (Brüel *et al.* 2012).

3.1.3. Trigger-Faktor besitzt klassische Chaperoneigenschaften

Da Trigger-Faktor bevorzugt entfaltete Proteine bindet, ist er definitionsgemäß nicht nur ein Enzym, sondern auch ein Chaperon. Eine typische Eigenschaft der Chaperone ist es, die Aggregation denaturierter Proteine zu verhindern oder zumindest zu unterdrücken. In verschiedenen Publikationen wurde eine derartige Aggregationsunterdrückung durch Trigger-Faktor *in vitro* (Scholz 1999; Huang *et al.* 2000) und *in vivo* (Li *et al.* 2001) gezeigt. Eine vollständige Unterdrückung der Aggregation *in vitro* konnte bisher jedoch noch nicht beobachtet werden.

In dieser Arbeit wurde der häufig zur Messung von Chaperonaktivitäten benutzte Aggregationstest mit Citratsynthase als Substrat angewandt (Buchner *et al.* 1998). Dabei wird die dimere Citratsynthase in 6 M GdmCl entfaltet und anschließend in Rückfaltungsbedingungen verdünnt. Aufgrund ihrer nun exponierten hydrophoben Reste und ihrer langsamen Rückfaltung neigt die Citratsynthase dabei stark zur Aggregation. Diese kann über die konzentrationsabhängige Zunahme der Lichtstreuung der Rückfaltungslösung beobachtet werden.

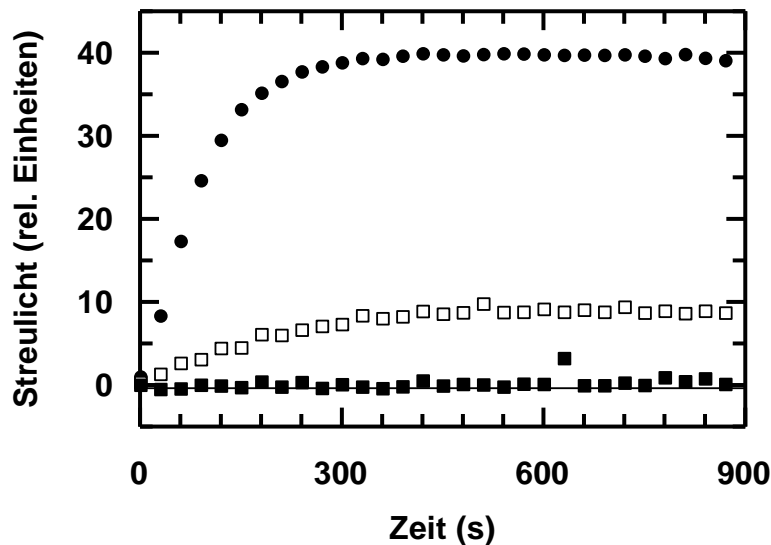


Abb. 3-10: Unterdrückung der Aggregation chaotrop denaturierter Citratsynthase durch den Trigger-Faktor aus *E. coli*. Citratsynthase wurde bei Raumtemperatur in 6,0 M GdmCl, 20 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,7 eine Stunde lang entfaltet und anschließend 100-fach auf eine Endkonzentration von 0,15 µM (Monomer) in 60 mM GdmCl, 0,2 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,7 bei 25°C verdünnt. Die Aggregation wurde über die Zunahme des Streulichts bei 360 nm in Abwesenheit (●) und in Gegenwart von 3,0 (□) und 6,0 (■) µM Trigger-Faktor beobachtet. Die Streulichtintensität von Puffer und Trigger-Faktor wurde von den gemessenen Werten abgezogen.

Anders als in den Veröffentlichungen zuvor geschildert, ist es tatsächlich möglich, diese Aggregation durch Trigger-Faktor aus *E. coli* quantitativ zu verhindern (Abb. 3-10). Allerdings ist dazu ein 40-facher Überschuss an Trigger-Faktor nötig. Außerdem gelang diese vollständige Unterdrückung nur mit wenigen Proteinchargen des Trigger-Faktors. Verglichen mit anderen Chaperonen wie beispielsweise GroEL (Höll-Neugebauer *et al.* 1991) ist die Chaperonwirkung des Trigger-Faktors äußerst schwach. Grund dafür dürfte zum einen die im Vergleich zu anderen Chaperonen relativ geringe Substrataffinität mit Dissoziationskonstanten im Bereich von 1 µM und zum anderen die hohe Dynamik der Substratbindung mit der immer wieder stattfindenden Freisetzung der entfalteten Peptidkette sein. Außerdem konnten später verschiedene Gruppen zeigen, dass die Bindung des Trigger-Faktors ans Ribosom eine strukturelle Öffnung des TF und somit vermutlich eine bessere Exposition seiner Substratbindungsbereiche bewirkt (Baram *et al.* 2005; Kaiser *et al.* 2006). Wahrscheinlich erreicht der TF daher auch erst durch diese Ribosomenbindung seine volle Chaperonaktivität, und vermutlich sind daher auch die aus dem Ribosom herausragenden naszierenden Proteinketten die bevorzugten Substrate des Trigger-Faktors und nicht frei in Lösung vorliegende entfaltete Proteine. Ein vereinfachter *in vitro*-Test wie das hier verwendete Citratsynthase-System kann daher das tatsächliche Potential des Trigger-Faktors als Chaperon nur andeutungsweise beschreiben.

3.1.4. Trigger-Faktor bildet Dimere

Trigger-Faktor bindet – wie viele andere Chaperone – an exponierte hydrophobe Reste entfalteter Proteine (vgl. Abschnitt 3.1.2.). Aus diesem Grund sollte er im Bereich seiner Proteinbindungsstelle selbst oberflächenexponierte hydrophobe Seitenketten besitzen und somit möglicherweise auch an andere Trigger-Faktor-Moleküle binden. Erste Hinweise auf eine solche Selbstassoziation stammten von Gelfiltrationsexperimenten: Obwohl Trigger-Faktor eine Molekülmasse von 48 kDa besitzt, entsprach sein Elutionsverhalten bei der Gelfiltration dem eines globulären Proteins von 66 kDa (Hesterkamp *et al.* 1997).

Aus diesem Grund wurde der bereits erwähnte TF W151F sowie der für Ribosomenbindungsstudien (vgl. Abschnitt 3.1.7.) benutzte fluoreszenzmarkierte BADAN-TF R14C mittels analytischer Ultrazentrifugation auf eine mögliche Oligomerisierung hin getestet. Diese Messungen wurden von H. Lilie am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle durchgeführt. Bei Sedimentations-Gleichgewichtsanalysen mit Proteinkonzentrationen zwischen 0,2 μM und 20 μM zeigten beide Proteine die Tendenz zur Dimerisierung mit Dissoziationskonstanten von 1,8 μM bzw. 3,5 μM für TF W151F (Abb. 3-11) bzw. BADAN-TF R14C (Daten nicht gezeigt).

Trigger-Faktor dimerisiert also partiell in dem Konzentrationsbereich, in welchem er für die Substrat- und Ribosomenbindungsstudien dieser Arbeit eingesetzt wurde. Eine spätere

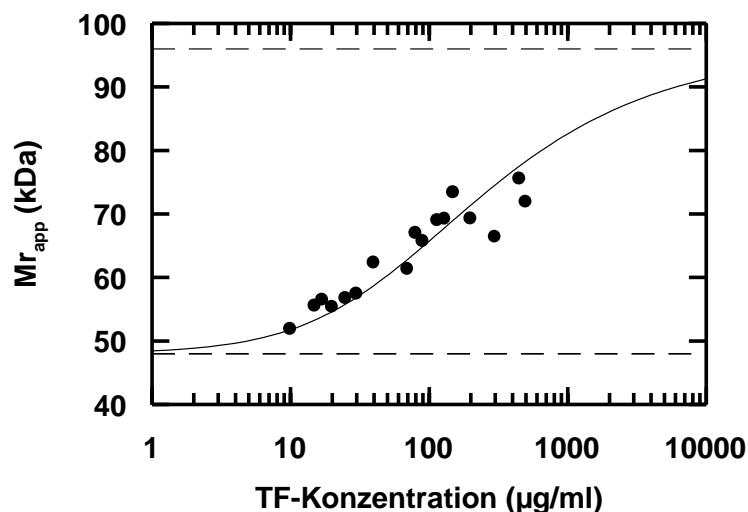


Abb. 3-11: Analytische Ultrazentrifugation zur Messung der Dimerisierung von Trigger-Faktor.

Das Sedimentationsgleichgewicht von 10 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ TF W151F wurde bei 14.000 rpm in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 20°C anhand der Absorption bei 230 nm (für Proteinkonzentrationen < 300 $\mu\text{g/ml}$) und 280 nm (Konzentrationen > 300 $\mu\text{g/ml}$) gemessen. Die apparenten Werte der molaren Masse wurden mittels der Software von Beckman Instruments unter Annahme eines partiellen spezifischen Volumens des Trigger-Faktors von 0,73 ml/g berechnet und gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen. Die durchgezogene Linie zeigt den Anstieg einer Dimerisierungskurve an die Datenpunkte mit einer Dissoziationskonstanten von 1,8 μM . Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Molekulargewichte des Monomers (48 kDa) und des Dimers (96 kDa). Die Daten wurden von H. Lilie (Halle/Saale) ermittelt.

Arbeit (Kaiser *et al.* 2006) bestätigte die Annahme, dass vermutlich nur Trigger-Faktor-Monomere an Substratproteine und Ribosomen binden können. Die vor der jeweiligen Bindung notwendige Monomerisierung dürfte daher die Abweichung der Ergebnisse beider Bindungsstudien von einem einfachen Einschnitt-Bindungsmodell erklären. Mögliche Auswirkungen des Monomer-Dimer-Gleichgewichts *in vivo* werden im Abschnitt zur Ribosomenbindung des Trigger-Faktors auf S. 76 diskutiert.

3.1.5. Trigger-Faktor bewirkt die Entfaltung eines Proteins mit geringer Stabilität

Wenn Trigger-Faktor tatsächlich ausschließlich, oder zumindest bevorzugt an die entfaltete Form von Proteinen bindet, sollte er bei Proteinen mit geringer thermodynamischer Stabilität das Gleichgewicht zwischen nativem (N) und entfaltetem (U) Zustand in Richtung des entfalteten Zustands verschieben. Eine derartige thermodynamische Kopplung (s. Schema 3-2) zwischen der Bindung an U (charakterisiert durch die Assoziationskonstante $K_A = 1/K_D$) und dem Entfaltungsgleichgewicht (charakterisiert durch die Gleichgewichtskonstante $K_{NU} = 1/K_{UN}$) konnte bereits für das Chaperon GroEL gezeigt werden (Walter *et al.* 1996).



Schema 3-2: Modell für die thermodynamische Kopplung zwischen der bevorzugten Bindung des entfalteten Proteins an TF und dem Entfaltungsgleichgewicht. U bezeichnet die freie entfaltete Form, N die native Form eines Substratproteins, TF die freie Form von Trigger-Faktor und U·TF den Komplex aus Trigger-Faktor und der entfalteten Form des Substratproteins.

Um zu testen, ob Trigger-Faktor ebenfalls durch die bevorzugte Bindung an denaturierte Proteine eine Entfaltung bewirken kann, wurde die bereits mehrfach erwähnte RCM-T1-Variante der Ribonuklease T1 verwendet. Durch die reduktive Öffnung der beiden Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten 2 und 10 sowie 6 und 103 wird das Protein so stark destabilisiert, dass es nur durch die Zugabe von NaCl in hoher Konzentration in einen nativähnlichen Zustand überführt werden kann.

Der NaCl-induzierte Faltungsübergang (Abb. 3-12) zeigt einen Mittelpunkt nahe 0,8 M NaCl. Ab 2,0 M NaCl ist RCM-T1 nahezu vollständig gefaltet. Bei 1,5 M NaCl liegen noch etwa 90 % der Moleküle im nativähnlichen Zustand vor. Aus diesem Grund ist die gemessene Entfaltungsamplitude bei einem Sprung von 2,0 M zu 1,5 M NaCl in Abwesenheit von Trigger-Faktor (Abb. 3-13 A, oberste Kurve) sehr klein. Während in gefalteter RCM-T1 die Tyr38-Pro39-Peptidbindung in der *cis*-Konformation vorliegt, stellt sich im entfalteten Protein ein Gleichgewicht zwischen etwa 15 % U^{39cis} und 85 % $U^{39trans}$ ein (Mücke & Schmid 1994b). Für die Entfaltung bei 1,5 M NaCl ist also die Isomerisierung von U^{39cis} nach $U^{39trans}$ die wichtigste

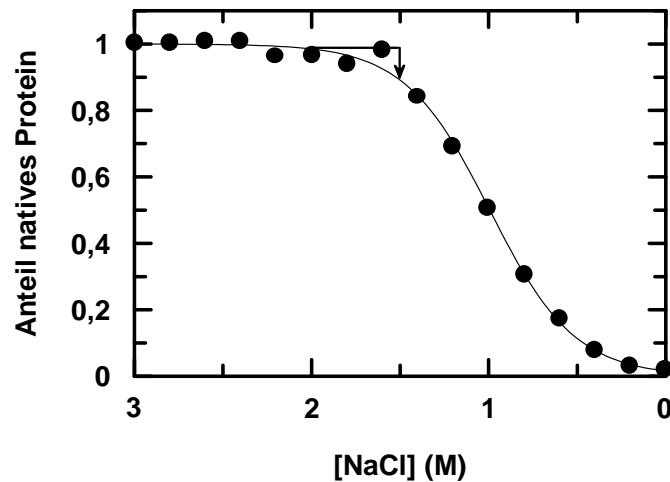


Abb. 3-12: NaCl-induzierter Faltungsübergang von RCM-T1. Aufgetragen ist der Anteil an gefaltetem Protein als Funktion der NaCl-Konzentration in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C (Daten aus (Mücke & Schmid 1994a)). Ein Sprung von 2,0 zu 1,5 M NaCl (s. Pfeil) führt zur Entfaltung von ca. 10 % der RCM-T1 Moleküle.

treibende Kraft und die beobachtete Rate wird bestimmt durch die Geschwindigkeit dieser Isomerisierung.

Die Zugabe von Trigger-Faktor führt zu starken Veränderungen der Entfaltungskinetiken (Abb. 3-13 A). Dabei wird die Doppelfunktion des Trigger-Faktors als Katalysator von prolin-limitierten Faltungsreaktionen und als Chaperon, das an entfaltete Proteine bindet, deutlich. Solange die Konzentration an Trigger-Faktor viel niedriger ist als die des Substrates RCM-T1, dominiert die Isomerasefunktion: Die Amplitude der Entfaltungsreaktion bleibt nahezu unverändert, aber ihre Geschwindigkeit nimmt stark zu (Abb. 3-13 A und C (Insert)), weil Trigger-Faktor die geschwindigkeitsbestimmende Isomerisierung an Pro39 katalysiert.

Diese Beschleunigung der Entfaltung bestätigt, dass Trigger-Faktor Prolylisomerisierungen sowohl in Entfaltungs- als auch in Rückfaltungsrichtung katalysiert. Die Richtung wird dabei nicht durch den Trigger-Faktor, sondern nur durch die Stabilität des Substratproteins und die Faltungsbedingungen bestimmt.

Erreicht die Konzentration an Trigger-Faktor die eingesetzte Substratkonzentration (stöchiometrischer Bereich), so gewinnt seine Chaperonfunktion an Bedeutung. Trigger-Faktor katalysiert nicht mehr nur die Entfaltung, sondern er bindet die entfalteten Moleküle und verschiebt so auch das $N \rightleftharpoons U$ Gleichgewicht in Richtung von U (vgl. Schema 3-2). Das zeigt sich durch die starke Zunahme der Amplituden der Entfaltung (Abb. 3-13 A, B). Diese Amplituden folgen einer Bindungskurve, aus der sich eine apparente Dissoziationskonstante $K_D(\text{app})$ von 11,5 μM für den Komplex aus TFW151F und RCM-T1 ergibt. $K_D(\text{app})$ ist das Produkt aus der Stabilitätskonstanten K_{UN} ($= 1/K_{NU}$) und der intrinsischen Dissoziationskonstanten des Komplexes K_D ($= 1/K_A$, vgl. Schema 3-2).

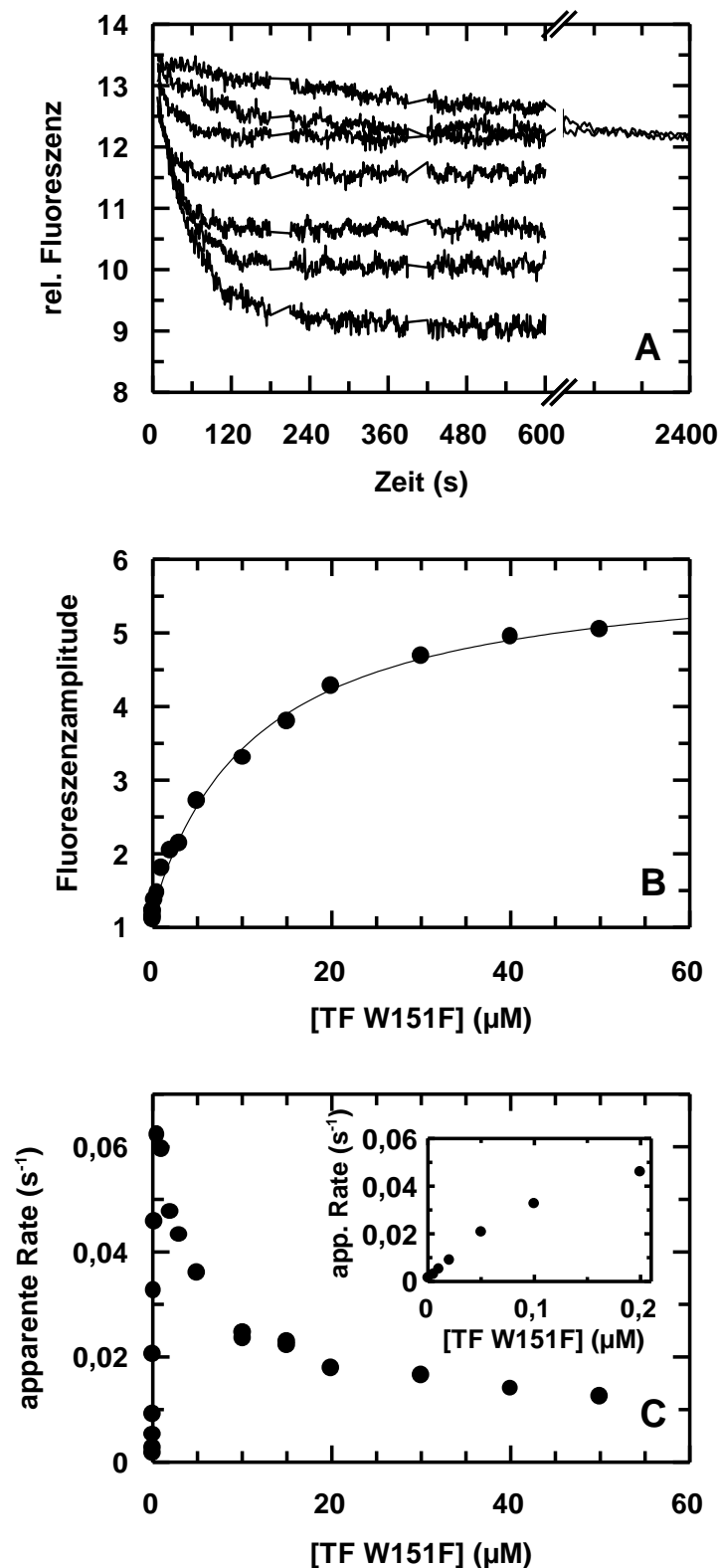


Abb. 3-13: Trigger-Faktor-induzierte Entfaltung von RCM-T1. (A) Zeitlicher Verlauf der Entfaltung von 1,0 μM RCM-T1 in Gegenwart von 0, 0,02, 0,1, 1, 5, 10 und 20 μM TF W151F (von oben nach unten). Die Kurven sind auf identische Startwerte normiert. Die Entfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung gefalteter RCM-T1 auf eine Endkonzentration von 1,0 μM in 1,5 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die langsame Phase der Entfaltung wurden jeweils monoexponentielle Funktionen angeglichen. (B) Abhängigkeit der Amplitude der Entfaltung von der Trigger-Faktor-Konzentration. Der Angleich einer Bindungskurve an die Datenpunkte (durchgezogene Linie) ergibt einen apparenten K_D -Wert von 11,5 μM . (C) Abhängigkeit der apparenten Raten der Entfaltung von der Trigger-Faktor-Konzentration. Die Zusatzabbildung in (C) zeigt die apparenten Raten bei niedrigen TF-Konzentrationen.

Da unter den gewählten Bedingungen die Stabilitätskonstante K_{UN} etwa 0,1 beträgt (s. Abb. 3-12), errechnet sich ein intrinsischer K_D -Wert von 1,1 μM . Dieser stimmt sehr gut mit dem K_M -Wert von 1,0 μM überein, der für die Faltungskatalyse von RCM-T1 durch Trigger-Faktor bestimmt wurde (Scholz *et al.* 1997b).

Die zunehmende Bildung des U·TF-Komplexes bei hoher Trigger-Faktor-Konzentration senkt die Konzentration freier U-Spezies. Diese Konzentrationserniedrigung sollte die $N \rightleftharpoons U$ Gleichgewichtseinstellung verlangsamen, da bei den vorliegenden Bedingungen von 1,5 M NaCl die Geschwindigkeit des $N \rightleftharpoons U^{39cis}$ Faltungsschrittes durch die Rückfaltungsreaktion $U^{39cis} \rightarrow N$ dominiert wird und somit stark von der Konzentration an freier U^{39cis} -Spezies abhängt. Tatsächlich sinkt im vorliegenden Experiment die gemessene apparente Rate k_{app} (Abb. 3-13 C) nach dem Erreichen eines Maximalwertes von 0,062 s^{-1} bei 0,5 μM TF W151F auf 0,012 s^{-1} bei 50 μM TF W151F.

Das wichtigste Ergebnis dieses Experimentes ist allerdings, dass Trigger-Faktor durch die bevorzugte Bindung entfalteter Proteine bei Proteinen mit geringer Stabilität tatsächlich das Gleichgewicht zwischen nativem und entfaltetem Zustand in Richtung des entfalteten Zustands verschieben kann.

3.1.6. Trigger-Faktor verlangsamt konformationelle Faltungsschritte

Trigger-Faktor bindet nicht nur an prolinhaltige Regionen, sondern auch an andere Bereiche entfalteter Proteinketten (Abschnitt 3.1.2) (Scholz *et al.* 1998; Patzelt *et al.* 2001). Daher sollte diese relativ unspezifische Substratbindung auch Proteinfaltungsreaktionen beeinflussen, die nicht mit einer Prolylisomerisierung gekoppelt sind. Allerdings dürften diese Einflüsse aufgrund der sehr dynamischen Substratbindung des Trigger-Faktors wesentlich geringer sein als bei anderen Chaperonen, die häufig die Rückfaltung ihrer Substrate durch statische Bindung deutlich verlangsamen bzw. völlig blockieren können (Goloubinoff *et al.* 1989; Buchberger *et al.* 1996).

3.1.6.1. Verlangsamung der Rückfaltung von apo- α -Lactalbumin

Das native Rinder- α -Lactalbumin enthält keine *cis*-Prolylbindungen und somit spielen Prolylisomerisierungen keine entscheidende Rolle bei dessen Faltung. Ca^{2+} -freies α -Lactalbumin (apo-La) bildet bei seiner Rückfaltung sehr schnell ein teilgefaltetes *molten globule* Intermediat, das sich dann im geschwindigkeitsbestimmenden zweiten Faltungsschritt langsam in den nativen Zustand umwandelt (Arai & Kuwajima 1996; Kuwajima 1996). Bei beiden Teilschritten auf dem Weg vom ungefalteten zum nativen Protein nimmt die Tryptophanfluoreszenz des Lactalbumins ab, wobei die Gleichgewichtseinstellung des ersten Schrittes so schnell erfolgt, dass dieser nach Handmischung nicht mehr verfolgt werden kann.

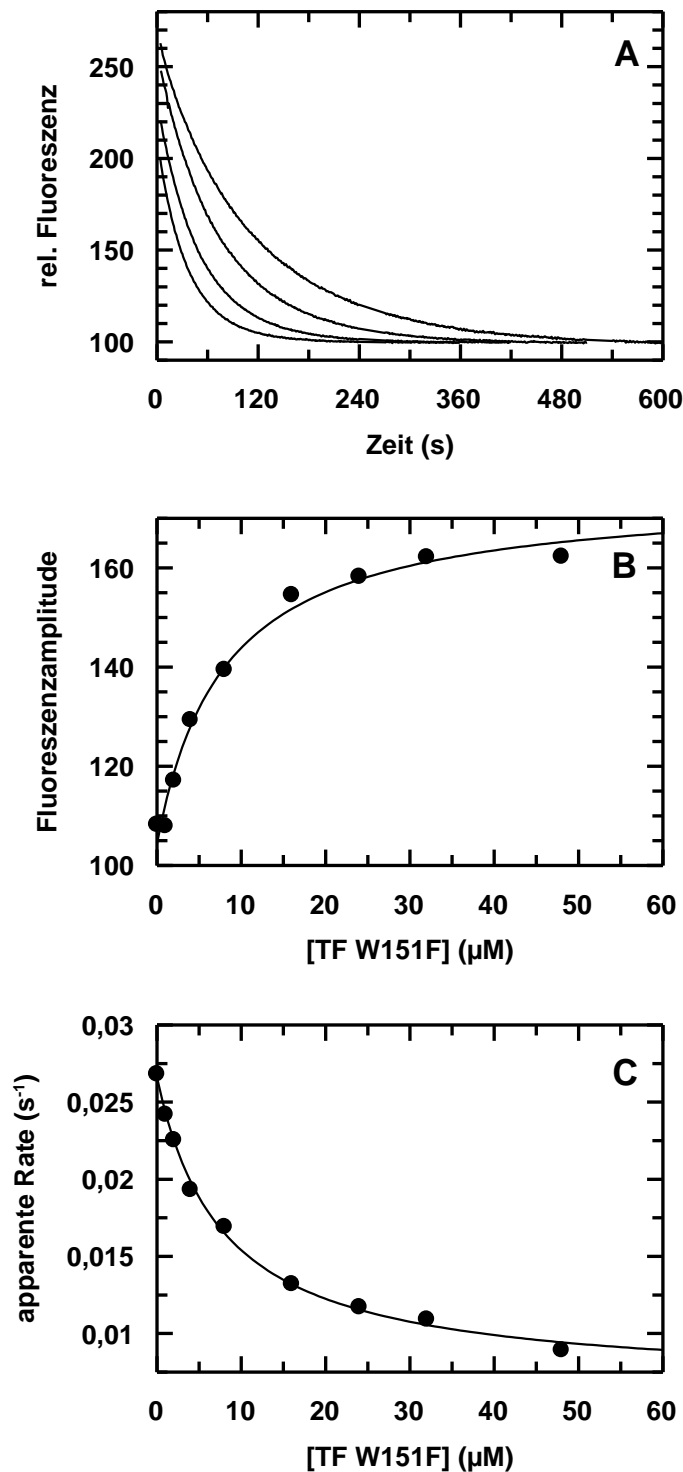
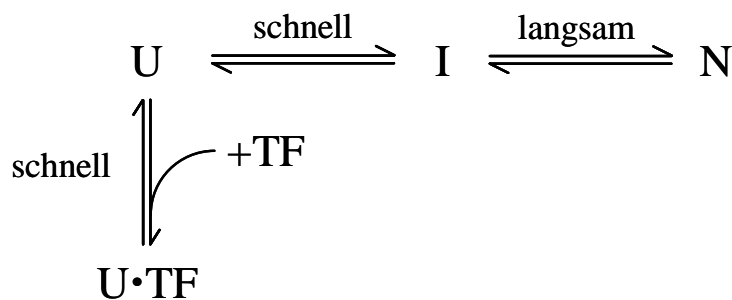


Abb. 3-14: Durch Trigger-Faktor verlangsamte Rückfaltung von apo-La. (A) Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von 2 μM apo-La in Gegenwart von 0, 4, 16 und 48 μM TF W151F (von unten nach oben). Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. Apo-La wurde in 5 mM EGTA, 6,0 M GdmCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei Raumtemperatur 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde durch 90-fache Verdünnung auf 2,0 μM apo-La in 67 mM GdmCl, 5 mM EGTA, 2,0 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C initiiert und über die Fluoreszenzänderung bei 340 nm beobachtet. An die Fluoreszenzkurven wurden monoexponentielle Funktionen angeglichen. (B) Abhängigkeit der apparenten Raten und (C) der Amplituden der Rückfaltung von der Trigger-Faktor-Konzentration. Ein Angleich hyperbolischer Bindungskurven (durchgezogene Linien) an die Amplituden bzw. Raten ergab apparente Dissoziationskonstanten von 8,0 bzw. 7,8 μM .

Im hier beschriebenen Experiment wurde apo-La in 6 M GdmCl entfaltet und anschließend die Rückfaltung durch 90-fache Verdünnung auf 2,0 μM apo-La in 67 mM GdmCl, 5 mM EGTA, 2,0 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C initiiert und über die Fluoreszenzänderung bei 340 nm beobachtet. Unter diesen Versuchsbedingungen beträgt die Rate des langsamen zweiten Faltungsschrittes 0,027 s^{-1} (Abb. 3-14 A, unterste Kurve). Die Gegenwart von Trigger-Faktor beeinflusst sowohl die Rate als auch die Amplitude der Faltungsreaktion. Mit zunehmender Trigger-Faktor-Konzentration sinkt diese Rate bis auf einen Wert von 0,009 s^{-1} bei 48 μM TF (Abb. 3-14 A, oberste Kurve). Die Messung bei derart hohen Trigger-Faktor-Konzentrationen war nur mit der schwach fluoreszierenden tryptophanfreien TF W151F-Variante möglich.

Gleichzeitig zur Abnahme der Rate steigt die Amplitude der beobachteten Reaktion mit zunehmender TF-Konzentration um bis zu 50 % an (Abb. 3-14 B). Dies lässt sich dadurch erklären, dass TF nur an die entfaltete Form von apo-La binden kann (U, Schema 3-3). Je höher die zugesetzte Trigger-Faktor-Konzentration ist, desto mehr der entfalteten Moleküle U werden in den Komplex U·TF gezogen.



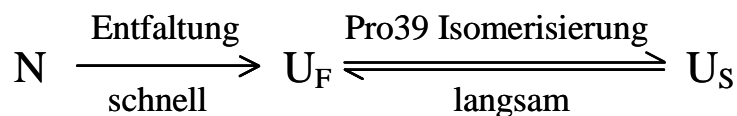
Schema 3-3: Kinetisches Modell für die Rückfaltung von apo-La in Gegenwart von Trigger-Faktor. U bezeichnet die freie entfaltete Form, I das *molten globule* Intermediat und N die native Form von apo-La, TF die freie Form von Trigger-Faktor und U·TF den Komplex aus Trigger-Faktor und der entfalteten Form von apo-La.

Dies führt zu einer Erniedrigung der Konzentration des *molten globule* Intermediats I und somit zur Abnahme der beobachteten Faltungsrate, welche die Reaktion von I nach N beschreibt. Außerdem steigt die Fluoreszenz, wenn I in U umgewandelt wird, und wahrscheinlich führt die Bindung an TF noch zu einer weiteren Fluoreszenzerhöhung (vgl. Abb. 3-3). Dies erhöht den Fluoreszenzstartwert und somit die beobachtete Amplitude der Rückfaltung von apo-La.

Die Analyse der Auftragung der Amplituden und Raten (Abb. 3-14 B und C) ergibt apparente Dissoziationskonstanten $K_D(\text{app})$ von 8,0 und 7,8 μM für den Komplex zwischen entfaltetem apo-La und TF, wobei die intrinsische Dissoziationskonstante K_D für den U·TF-Komplex kleiner sein dürfte als die apparent gemessene Konstante $K_D(\text{app})$, da letztere auch die Gleichgewichtskonstante zwischen U und I einschließt.

3.1.6.2. Verlangsamung der Rückfaltung von RCM-T1

Ebenso wie im Falle von RCM-La verzögert Trigger-Faktor auch bei RCM-T1 den konformationellen Faltungsschritt (vgl. Abschnitt 3.1.5.). Entfaltete RCM-T1 liegt nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes zu etwa 85 % in der U_S -Form vor, d.h. mit der nicht-nativen *trans*-Konformation an Pro39, und nur zu 15 % in der U_F -Form mit korrektem *cis*-Pro39 (Mücke & Schmid 1994b). Die U_F -Moleküle falten (bei 2 M NaCl und 15°C) sehr schnell im Bereich von einer Sekunde zurück, während die U_S -Moleküle dafür mehrere Minuten benötigen, da ihre Faltung durch die *trans*→*cis*-Isomerisierung der Tyr38-Pro39-Peptidbindung limitiert ist. Der Effekt von Trigger-Faktor auf die schnelle Phase der Rückfaltung dieser 15% U_F -Moleküle ist sehr schwer zu beobachten, da die gesamte Reaktion stark von der langsamen Faltung der 85 % U_S -Moleküle dominiert wird. Man kann jedoch vorübergehend einen hohen Anteil an U_F -Spezies erzeugen, wenn man nur einen kurzen Entfaltungspuls auf die native RCM-T1 anwendet. Dieser Puls muss gerade lang genug sein, um den konformationellen Entfaltungsschritt $N \rightarrow U_F$ nahezu vollständig ablaufen zu lassen. Andererseits muss er aber auch so kurz sein, dass die nachfolgende *cis*→*trans* Isomerisierung an Pro39 kaum stattfindet, welche sonst den Großteil von U_F langsam in U_S überführt (Schema 3-4).



Schema 3-4: Kinetisches Modell für die Entfaltung von RCM-T1. N bezeichnet die gefaltete Form, U_F die schnell rückfaltende und U_S die langsam rückfaltende denaturierte Form von RCM-T1.

Anschließend muss sofort die Rückfaltung induziert werden, weshalb man hier auch von „Doppelsprungexperimenten“ spricht. Im vorliegenden Fall wurde die Entfaltung durch Verdünnung der RCM-T1-Lösung von 1,8 auf 0,16 M NaCl initiiert (vgl. Abb. 3-12). Unter diesen Bedingungen besitzt die $N \rightarrow U_F$ Reaktion eine Zeitkonstante von 9 s, während der nachfolgende Isomerisierungsschritt mit einer Zeitkonstante von 90 s abläuft (Mücke & Schmid 1994a). Nach 10 s Entfaltung liegen somit ca. 58 % aller Moleküle im U_F -Zustand, 38% nach wie vor im gefalteten N-Zustand und nur 4 % bereits im langsam faltenden U_S -Zustand vor. Diese Mischung wird dann unverzüglich zur Messung der Rückfaltung in 2,0 M NaCl bei 15°C eingesetzt. Die Rückfaltung der hauptsächlich erzeugten U_F -Moleküle läuft innerhalb von ca. 5 s ab und ist daher in einem Handmischexperiment kaum aufzulösen (Abb. 3-15 A, oberste Kurve). Nur noch das Ende dieser schnellen Phase ist zu erkennen. Die ca. 4 % U_S -Moleküle reagieren langsam und bewirken eine langsame Faltungsphase mit sehr kleiner Amplitude.

Die Zugabe von Trigger-Faktor in steigenden Konzentrationen ändert die Faltungskinetiken drastisch. Die nicht sichtbare schnelle Faltungsphase verliert deutlich Amplitudenanteile

an die langsame Phase (Abb. 3-15 A). Gleichzeitig steigt die Rate der langsamen Phase von $0,008 \text{ s}^{-1}$ zehnfach auf einen Wert von $0,08 \text{ s}^{-1}$ an, solange sich die Trigger-Faktor-Konzentration im katalytischen Bereich bewegt. Sobald jedoch die Trigger-Faktor-Konzentration über die eingesetzte Substratkonzentration ($1 \mu\text{M}$) hinaus erhöht wird, sinkt die Rate der langsamen Rückfaltungsphase wieder (Abb. 3-15 B).

Dieser auf den ersten Blick sehr komplexe Einfluss von Trigger-Faktor auf die Rückfaltung von RCM-T1 ist - wie schon im vorangegangenen Kapitel zur Trigger-Faktor-induzierten Entfaltung beschrieben - auf die duale Funktionsweise des Trigger-Faktors zurückzuführen: Er

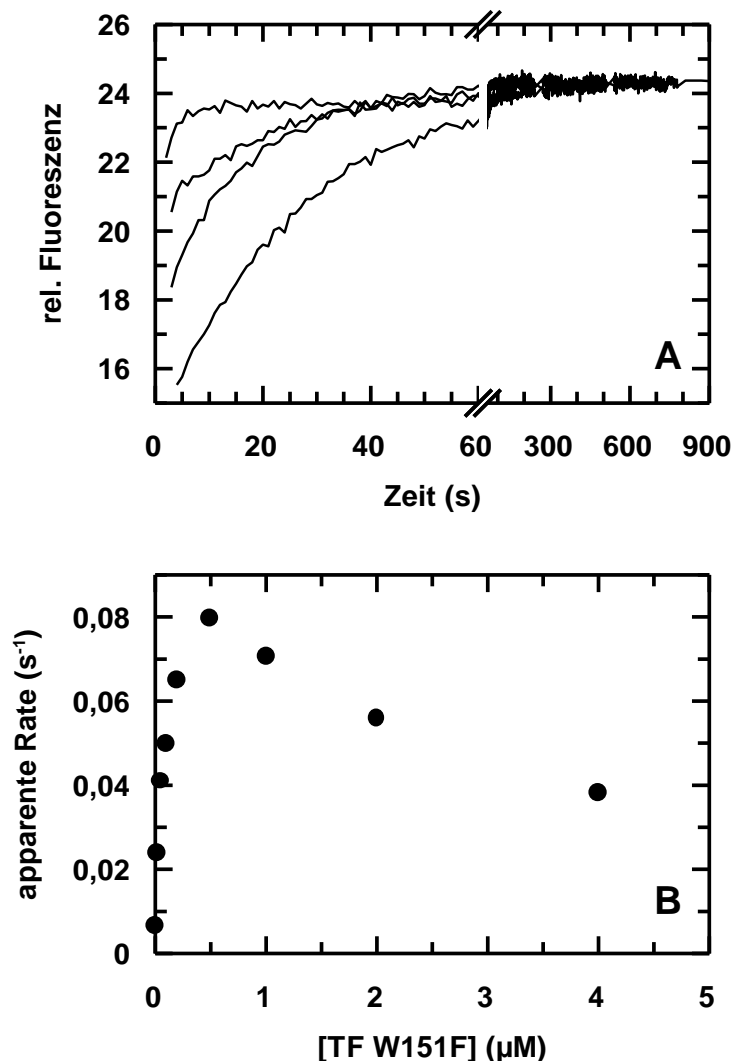
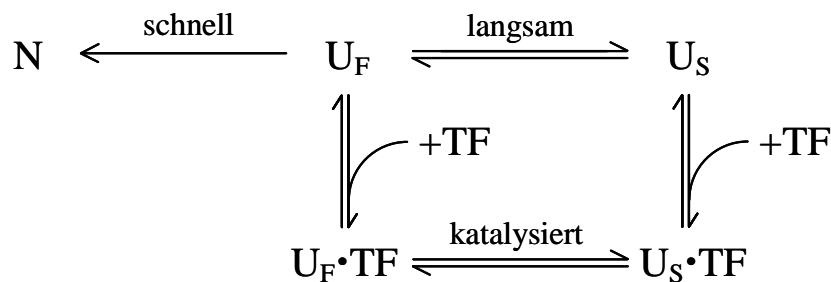


Abb. 3-15: Durch Trigger-Faktor verlangsamte Rückfaltung von RCM-T1 mit „korrekten“ Prolylbindungen. (A) Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von $1,0 \mu\text{M}$ RCM-T1 in Gegenwart von 0, 0,05, 0,2 und $4,0 \mu\text{M}$ TF W151F (von oben nach unten). Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. Gefaltete RCM-T1 in $1,8 \text{ M NaCl}$, $0,1 \text{ M Tris/HCl}$ pH 8,0 wurde 10 s bei 15°C in $0,16 \text{ M NaCl}$, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 10-fache Verdünnung auf $1,0 \mu\text{M}$ RCM-T1 in $2,0 \text{ M NaCl}$, $0,1 \text{ M Tris/HCl}$ pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die langsame Phase der Faltung wurden jeweils monoexponentielle Funktionen angeglichen. (B) Abhängigkeit der apparenten Raten der langsamen Phase der Rückfaltung von der Trigger-Faktor-Konzentration.

ist einerseits ein katalysierendes Enzym, andererseits aber auch ein proteinbindendes Chaperon. In Abwesenheit von Trigger-Faktor ist die $U_F \rightarrow U_S$ Isomerisierung an Pro39 viel langsamer als die Rückfaltung $U_F \rightarrow N$. Deshalb falten die während des zehnssekündigen Entfaltungspulses gebildeten U_F -Moleküle rasch zum nativähnlichen Zustand zurück (Schema 3-5).

Bei Zugabe geringer Konzentrationen an Trigger-Faktor wirkt dieser hauptsächlich als Prolylisomerase und beschleunigt die bisher langsame Isomerisierungsreaktion im entfalteten Protein, so dass diese Isomerisierung in kinetische Konkurrenz zur Rückfaltungsreaktion $U_F \rightarrow N$ tritt. Mit steigender Trigger-Faktor-Konzentration wird der Anteil der U_F -Moleküle, die zu U_S isomerisieren, immer größer. Somit steigt die Amplitude der langsamen Phase auf Kosten der schnellen Phase an. Da Trigger-Faktor die Isomerisierung in beide Richtungen katalysiert, steigt mit zunehmender Enzymkonzentration auch die Geschwindigkeit der langsamen Phase. Wird Trigger-Faktor schließlich in stöchiometrischen Mengen zugesetzt, binden immer mehr der U_F - und U_S -Moleküle an dieses Chaperon und die Konzentration an faltungsfähiger freier Spezies U_F nimmt so stark ab, dass die Rückfaltung dadurch verlangsamt wird – wie auch im Fall des apo- α -Lactalbumin.



Schema 3-5: Kinetisches Modell für den Einfluss von Trigger-Faktor auf die Rückfaltung der U_F -Spezies von RCM-T1. N bezeichnet die gefaltete Form, U_F die schnell rückfaltende und U_S die langsam rückfaltende denaturierte Form von RCM-T1, TF den freien Trigger-Faktor und $U_F \cdot TF$ bzw. $U_S \cdot TF$ die Komplexe zwischen TF und der jeweiligen entfalteten RCM-T1-Spezies.

Wie erwartet nimmt Trigger-Faktor also tatsächlich durch Bindung des entfalteten Zustands Einfluss auf die Geschwindigkeit konformationeller Faltungsschritte. Eine vollständige Blockierung der Faltung findet aber aufgrund der sehr dynamischen Substratbindung (vgl. Abschnitt 3.1.1.) nicht statt. Die hier gezeigte drastische Verzögerung der Rückfaltung von RCM-T1 ist hauptsächlich auf den Umstand zurückzuführen, dass durch die katalytische Wirkung des Trigger-Faktors die langsam rückfaltende Spezies $U^{39trans}$ schneller gebildet wird.

Da in entfaltenen Proteinen das $cis \rightleftharpoons trans$ Gleichgewicht von Prolylbindungen deutlich auf der Seite der *trans*-Konformation liegt und dieses Gleichgewicht auch durch die Prolylisomerase nicht verschoben werden sollte, läuft die katalysierte Isomerisierung in $cis \rightarrow trans$ Richtung deutlich schneller ab als umgekehrt. Problematisch bei der Faltung sind somit potentiell Proteine, die in ihrer nativen Struktur *cis*-Prolylbindungen besitzen - wie RCM-T1. Dass

der Trigger-Faktor wie im vorliegenden Experiment eine große Population entfalteter Proteine bereits in der korrekten *cis*-Form vorfindet, die er in die langsam rückfaltende *trans*-Form überführen könnte, wird in der natürlichen zellulären Umgebung kaum vorkommen. Dort wechselwirkt Trigger-Faktor als ribosomenassoziiertes Chaperon hauptsächlich mit naszierenden Ketten. In diesen sollten ohnehin alle Peptidbindungen *trans*-Konformation besitzen.

Mittlerweile konnten Agashe *et al.* (2004) zeigen, dass Trigger-Faktor die Faltungsausbeute von neu synthetisierter β -Galactosidase und Glühwürmchen-Luziferase *in vitro* und *in vivo* erhöht, dies aber ebenfalls auf Kosten einer deutlich langsameren Faltungsgeschwindigkeit. Vermutlich besitzen diese großen ungefalteten Modellproteine zahlreiche Bindungsstellen für Chaperone wie Trigger-Faktor. Somit dürften auch mehrere Trigger-Faktor-Proteine gleichzeitig an eine so große Strukturdomäne binden. Die schnelle Faltung dieser Domänen würde voraussetzen, dass alle dort gebundenen Chaperonproteine diese koordiniert loslassen. Dafür gibt es bisher keinen experimentellen Hinweis. Somit scheint es wahrscheinlich, dass besonders große neu synthetisierte Proteine durch Bindung von Trigger-Faktor in ihrem entfaltenen Zustand stabilisiert werden und sich ihre Faltung dadurch verlangsamt. Diese Verschiebung des Faltungsmechanismus von einem ko- zu einem posttranslationalen Faltungsweg könnte ein Grund für die häufigen Probleme bei der rekombinanten Expression großer eukaryontischer Proteine in Bakterienzellen sein: Während diese Proteine bei der relativ langsamen Synthese an eukaryontischen Ribosomen kotranslational falten können, verhindert das bakterielle Trigger-Faktor-Chaperonsystem durch seine wiederholte schnelle Bindung im Millisekundenbereich (vgl. 3.1.1.) deren effiziente Faltung in bakteriellen Zellen.

3.1.7. Die Wechselwirkung des Trigger-Faktors mit dem Ribosom

Trigger-Faktor bindet an die große Untereinheit des Ribosoms (Lill *et al.* 1988). Diese Bindung wird durch die N-terminale Domäne des Trigger-Faktors vermittelt (Hesterkamp *et al.* 1997). Mittlerweile wurde das ribosomale Protein L23 als Bindungspartner des Trigger-Faktors identifiziert (Kramer *et al.* 2002; Blaha *et al.* 2003). Dieses befindet sich neben der Proteinaustrittsstelle des Ribosoms, wodurch es dem Trigger-Faktor ermöglicht wird, bereits während der Synthese mit der naszierenden Kette wechselzuwirken und diese eventuell nach Peptidbindungen abzusuchen, an denen eine Prolylisomerisierung katalysiert werden muss. Viele Proteine benötigen auch nach Abschluss ihrer Synthese noch die Hilfe einer Prolyliso-merase. Eine permanente starke Bindung des Trigger-Faktors ans Ribosom wäre deshalb von Nachteil für die *de novo*-Faltung, denn im Falle solch langsam faltender Proteine würde die Proteinaustrittsstelle unnötig lange blockiert. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, mit welcher Affinität und Dynamik der Trigger-Faktor ans Ribosom bindet.

3.1.7.1. Fluoreszenzmarkierung des Trigger-Faktors an Position 14

Zur Messung der Bindung des Trigger-Faktors ans Ribosom konnten keine natürlichen spektroskopischen Sonden verwendet werden, da Ribosomen aufgrund ihrer enormen Größe und ihres hohen Anteils an RNA Licht im Nah-UV-Bereich stark streuen und absorbieren. Jede natürliche Fluoreszenz- oder Absorptionsänderung bei der Bindung wäre dadurch nicht mehr detektierbar. Deshalb schien es am sinnvollsten, Trigger-Faktor mit einem Fluorophor zu markieren, der außerhalb des Absorptionsbereiches der Ribosomen angeregt werden kann. Dieser Fluorophor sollte am besten in der Nähe der Ribosomenbindungsstelle angehängt werden, um auch ein möglichst starkes Bindungssignal zu liefern. Andererseits sollte er auch nicht zu nahe an dieser Stelle liegen, um die Bindung nicht zu verfälschen oder zu behindern.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit lagen noch keine genaueren Informationen über die Struktur der N-terminalen Ribosomenbindungsdomäne vor. Sequenzvergleiche von Trigger-Faktoren aus verschiedenen Organismen zeigten allerdings einen konservierten Bereich innerhalb der N-terminalen Domäne mit dem vollständig konservierten Motiv Gly-Phe-Arg-Xaa-Gly-Lys-Xaa-Pro (s. Abb. 3-16).

<i>B. subtilis</i>	27-56	LDDAFKKVVKQVSIP GFRK GK I P RGLFEQR
<i>E. coli</i>	28-57	VKSELVNVAKKVRID GFRK GK V P MNIVAQR
<i>C. jejuni</i>	28-57	VENLAKKASKSVKMD GFR P GK V P SAVLKR
<i>H. pylori</i>	28-57	YDKIAQKIAQVKID GFR R GK V P LSLVKTR
<i>M. genitalium</i>	31-60	QKKLVGEMAKSIK I K GFR P GK I P NLASQS
<i>M. pneumoniae</i>	31-60	QQQTQDLTKNMK I K GFR K GK V P PTLAKDY
<i>Synechocystis</i>	28-57	YENVVKLLTRTVNIP GFR R GK V P RAIVIQR
Konsensus		kk k : i GFR GK : P v q r

Abb. 3-16: Sequenzvergleich der N-terminalen Regionen von Trigger-Faktoren aus verschiedenen Bakterienspezies. Die Proteinsequenzen sind im Einbuchstaben-Code angegeben. Vollständig konservierte Aminosäuren des Ribosomenbindungsmotivs sind fett gedruckt. Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programmes Multalin (Version 5.3.3) durchgeführt.

Kramer *et al.* konnten zeigen, dass die Reste Phe44, Arg45 und Lys46 im *E. coli* Trigger-Faktor für die Ribosomenbindung essentiell sind und dass die Dreifachmutante F44A/R45A/K46A (kurz TF FRK/AAA) bei Saccharosegradientenzentrifugation nicht mit dem Ribosom pelletiert (Kramer *et al.* 2002). Allerdings hat diese Mutation keinen Einfluss auf die Prolyl-isomeraseaktivität des Trigger-Faktors (Abb. 3-17). Die für diesen Test verwendeten Varianten His₆-TF und His₆-TF FRK/AAA wurden von E. Deuerling (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die im Vergleich zu den katalytischen Effizienzen der im eigenen Labor gereinigten Trigger-Faktorvarianten relativ niedrigen Werte von 500.000 bzw. 550.000 M⁻¹s⁻¹ sind vermutlich auf ein anderes Reinigungsprotokoll oder auf den vorhandenen His₆-Anhang zurückzuführen.

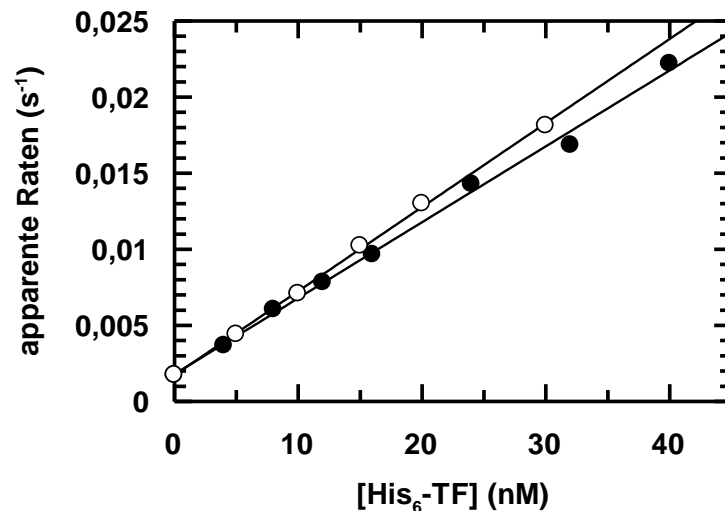


Abb. 3-17: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch His₆-Trigger-Faktor und His₆-Trigger-Faktor FRK/AAA. Abhängigkeit der apparenten Raten der langsamen Phase der Rückfaltung von 0,1 μ M RCM-T1 von der Konzentration an His₆-TF (●) und His₆-TF FRK/AAA (○). Die aus linearem Angleich an die Daten ermittelten katalytischen Effizienzen liegen bei 500.000 und 550.000 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für His₆-TF und His₆-TF FRK/AAA. RCM-T1 wurde bei 15°C in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 0,1 μ M RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe (Daten nicht gezeigt) wurden monoexponentielle Kurven angeglichen.

Am einfachsten können Fluoreszenzfarbstoffe selektiv an Cysteine angehängt werden. Der Trigger-Faktor aus *E. coli* besitzt zwar keine Cysteine, aber das Protein aus *Mycoplasma genitalium* enthält ein einziges Cystein an Position 17 (entspricht Position 14 im *E. coli* Trigger-Faktor). Diese Position schien die Voraussetzungen für eine geeignete Markierungsposition (nahe genug, aber nicht zu nahe am Ribosomenbindungsmotiv) zu erfüllen. Cys17 wurde mit Acrylodan markiert, so dass die N-terminale Domäne des *Mycoplasma*-Trigger-Faktors nun eine fluoreszierende Dimethylaminonaphthalingrouppe trug. Erste vorläufige Experimente ergaben, dass die Acrylodan-Fluoreszenz dieses Proteins bei Bindung an Ribosomen aus *E. coli* leicht abnahm (Daten nicht gezeigt). Da ein homologes Testsystem mit Trigger-Faktor und Ribosomen aus *E. coli* sinnvoller erschien als dieses vorläufige System mit Komponenten aus zwei verschiedenen Spezies, wurde ein Cystein auch an der entsprechenden Position im *E. coli*-Trigger-Faktor eingeführt. Die resultierende Variante TF R14C wurde unter reduzierenden Bedingungen gereinigt. Ihre katalytische Effizienz im RCM-T1-Rückfaltungstest lag bei $8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Daten nicht gezeigt) und somit im Bereich der Aktivität des Wildtyp-Enzyms.

In mehreren Vorversuchen wurde TF R14C dann mit den Fluoreszenzfarbstoffen Acrylodan, BADAN oder IAEDANS markiert. Die Bedingungen für die Markierungsreaktion wurden optimiert und die Fluoreszenzänderung der verschiedenen Farbstoffe bei Bindung des markierten Trigger-Faktors an *E. coli*-Ribosomen gemessen. Dabei stellte sich BADAN als der am besten geeignete Fluoreszenzmarker heraus. Er besitzt den gleichen Fluorophor wie Acrylodan, führt aber aufgrund einer anderen Ankopplungschemie in kürzerer Reaktionszeit zu höheren Markierungsausbeuten. Die Markierungseffizienz wurde durch Elektrospray-Massenspek-

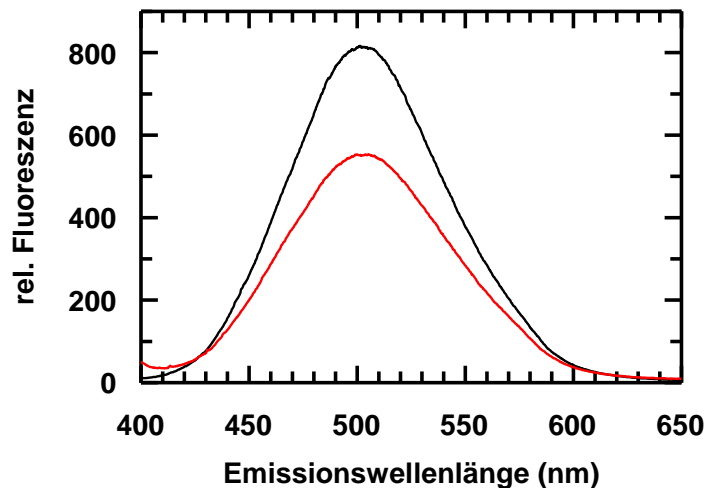


Abb. 3-18: Pufferkorrigierte Fluoreszenzspektren von 5 µM BADAN-TF R14C in Abwesenheit (—) und in Gegenwart von 5 µM Ribosomen (—). Die Messung erfolgte in 10 mM MgCl₂, 6 mM β-Mercaptoethanol, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 20°C mit Anregung bei 387 nm.

trometrie überprüft, wobei die Ausbeute an einfach markiertem Protein unter den gewählten Bedingungen mehr als 85 Prozent betrug. Auch diese fluoreszenzmarkierte Variante, BADAN-TF R14C, war noch aktiv im RCM-T1-Rückfaltungstest. Allerdings sank die katalytische Effizienz durch das Einführen der Fluoreszenzsonde auf $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 3-18 zeigt das Emissionsspektrum von 5 µM BADAN-TF R14C. Die optische Anregung des markierten BADAN-TF R14C erfolgte bei 387 nm, also weit entfernt vom Absorptionsmaximum der Ribosomen, und das Emissionsmaximum lag bei 505 nm (schwarze Kurve). Nach Zugabe von 5 µM Ribosomen sank die Fluoreszenz im Bereich des Maximums um ca. 35%, aber das Emissionsmaximum blieb bei ungefähr 500 nm (rote Kurve). Allerdings beruht der beobachtete Fluoreszenzunterschied nicht vollständig auf der Assoziation von BADAN-TF R14C und Ribosomen. So rührt die geringe Fluoreszenzzunahme im Wellenlängenbereich unter 430 nm vermutlich von der durch die Ribosomen verursachten Lichtstreuung her, während ein Teil der Fluoreszenzabnahme im Bereich des Maximums auch auf den so genannten „Inner-Filter-Effekt“, also auf die teilweise Absorption oder Streuung des Anregungslichtes durch die vorhandenen Ribosomen, zurückzuführen ist.

Die Mutation R14C wurde auch in die nicht ribosomenbindende Variante TF FRK/AAA eingeführt. Dieses Protein wurde ebenfalls mit BADAN markiert und als BADAN-TF R14C FRK/AAA für Kontrollexperimente eingesetzt.

3.1.7.2. Kinetik der Ribosomenbindung von fluoreszenzmarkiertem Trigger-Faktor

Die oben beschriebene Fluoreszenzänderung bei der Bindung von Trigger-Faktor an Ribosomen erfolgt sehr langsam und kann nach Handmischung im Fluorimeter beobachtet werden. Abbildung 3-19 A (blaue Kurve) zeigt den Zeitverlauf der Fluoreszenzabnahme nach Mi-

schung von 2 μM BADAN-TF R14C mit 2 μM Ribosomen. Die Assoziationskurve der beiden Bindungspartner zeigt einen monoexponentiellen Verlauf mit einer Zeitkonstanten von 96 s. Mischt man die Ribosomen mit der nicht ribosomenbindenden fluoreszenzmarkierten Variante BADAN-TF R14C FRK/AAA, so bleibt die BADAN-Fluoreszenz nahezu unverändert (Abb. 3-19 A, rote Kurve). Dies ist auch bei Verwendung höherer Konzentrationen (bis zu 20 μM , Daten nicht gezeigt) an BADAN-TF R14C FRK/AAA der Fall. Die Fluoreszenzabnahme beträgt weniger als 1 % in 10 min. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Abnahme in Gegenwart von BADAN-TF R14C auf eine unspezifische Wechselwirkung - beispielsweise zwischen Ribosom und Fluorophor - oder andere Einflüsse wie Zerstrahlung zurückzuführen ist. Vielmehr zeigt sie tatsächlich eine spezifische Assoziation von Trigger-Faktor mit dem Ribosom, bei der die Region F44/R45/K46 des Trigger-Faktors eine entscheidende Rolle spielt.

Der gebundene fluoreszenzmarkierte Trigger-Faktor kann durch unmarkierten Wildtyp-Trigger-Faktor aus dem Komplex mit dem Ribosom verdrängt werden (Abb. 3-19 B). Dabei steigt erwartungsgemäß die Fluoreszenz an (blaue Kurven). Unmarkierter TF FRK/AAA ist zu dieser Verdrängung nicht in der Lage (rote Kurve). Die minimale Fluoreszenzzunahme bei dieser Messung ist auf eine Dissoziation des markierten Trigger-Faktor-Ribosomen-Komplexes zurückzuführen, die durch die Verdünnung des Testansatzes bei Zugabe von TF FRK/AAA bewirkt wird. Derselbe Effekt ist auch bei Zugabe des äquivalenten Volumens an Puffer zu beobachten (schwarze Kurve).

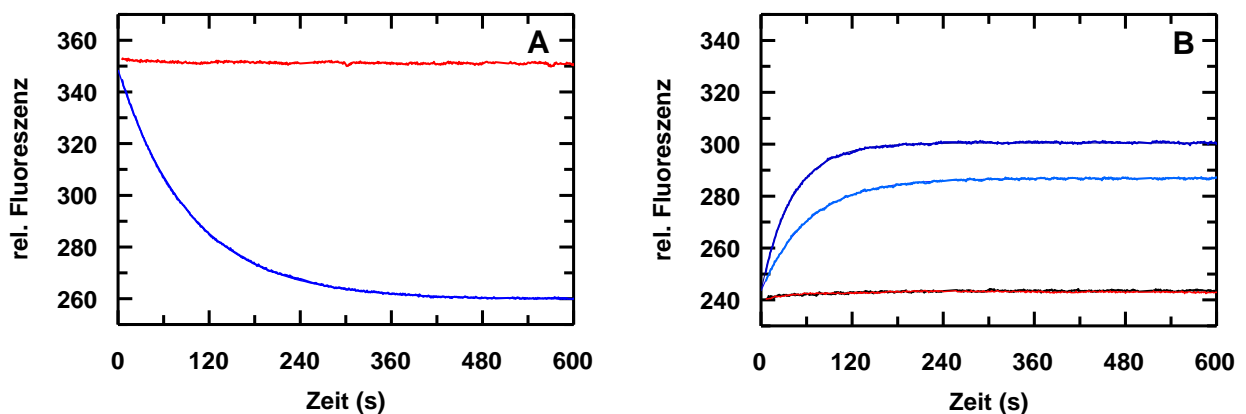


Abb. 3-19: (A) Kinetik der Assoziation von fluoreszenzmarkiertem Trigger-Faktor mit Ribosomen. Fluoreszenzabnahme bei 507 nm nach Mischung von 2 μM BADAN-TF R14C mit 2 μM Ribosomen (\rightarrow). Im Kontrollexperiment wurden 2 μM BADAN-TF R14C FRK/AAA mit 2 μM Ribosomen gemischt (\rightarrow). (B) Kinetik der Verdrängung von BADAN-TF R14C vom Ribosom. Ein Komplex aus 2 μM BADAN-TF R14C und 2 μM Ribosomen wurde bis zur Gleichgewichtseinstellung vorgebildet und dann mit 2 μM (\rightarrow) bzw. 4 μM (\rightarrow) unmarkiertem Wildtyp-Trigger-Faktor gemischt. Die Verdrängung des markierten Trigger-Faktors wurde durch die Fluoreszenzzunahme bei 507 nm beobachtet. Die unteren Kurven zeigen zur Kontrolle den Fluoreszenzverlauf nach Zugabe von 2 μM unmarkiertem TF FRK/AAA (\rightarrow) und nach Zugabe eines äquivalenten Volumens an reinem Messpuffer (\rightarrow). Sämtliche Messungen erfolgten in 10 mM MgCl_2 , 6 mM β -Mercaptoethanol, 20 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 20°C mit Anregung bei 387 nm. Der Anstieg monoexponentieller Funktionen (glatte Linien) an die Daten ergab apparente Geschwindigkeitskonstanten von 0,010 s^{-1} (Assoziation), 0,016 s^{-1} (Verdrängung mit 2 μM TF) und 0,024 s^{-1} (Verdrängung mit 4 μM TF).

Aufgrund dieser Befunde kann man als gesichert annehmen, dass die beobachtete Fluoreszenzabnahme von BADAN-TF R14C nach der Mischung mit Ribosomen (Abb. 3-19 A) tatsächlich die spezifische Interaktion dieser beiden Komponenten widerspiegelt.

3.1.7.3. Die Dissoziation des Trigger-Faktor-Ribosomen-Komplexes erfolgt sehr langsam

Die Freisetzung von BADAN-TF R14C aus dem Komplex mit 70S-Ribosomen führt zu einer Fluoreszenzzunahme. Wie oben beschrieben, kann eine Verdünnung des Komplexes zu dessen Dissoziation führen. Dazu wurden 10 μM BADAN-TF R14C 30 min lang mit 10 μM Ribosomen inkubiert, um eine Ausbildung des Komplexes zu ermöglichen. Dieser wurde anschließend durch Verdünnung auf Endkonzentrationen von je 200, 100 und 50 nM dissoziiert. Anhand der Zunahme der Fluoreszenz wurde diese Dissoziation beobachtet (Abb. 3-20).

Sie erfolgt sehr langsam mit Halbwertszeiten zwischen 11 s (bei 50 nM) und 19 s (200 nM). In Kontrollexperimenten wurde keine derartige Fluoreszenzänderung beobachtet, wenn 10 μM BADAN-TF R14C in Abwesenheit von Ribosomen auf 50, 100 und 200 nM verdünnt wurden (Abb. 3-20, gestrichelte Linien). Bei Vorliegen eines einfachen Ein-Schritt-Bindungsmodells für die Assoziation von Trigger-Faktor und Ribosom sollte keine derart große Abhängigkeit der Dissoziationsgeschwindigkeit von der Konzentration der Bindungspartner auftreten. Es deutet sich daher an, dass die Komplexbildung zwischen Trigger-Faktor und Ribosom möglicherweise einem komplexeren Mechanismus unterliegt. Es zeigt sich aber deutlich, dass die Dissoziation dieses Komplexes um Größenordnungen langsamer abläuft als die Dissoziation des Trigger-Faktor-Substrat-Komplexes, welche im Millisekundenbereich stattfindet (vgl. Abschnitt 3.1.1.2.).

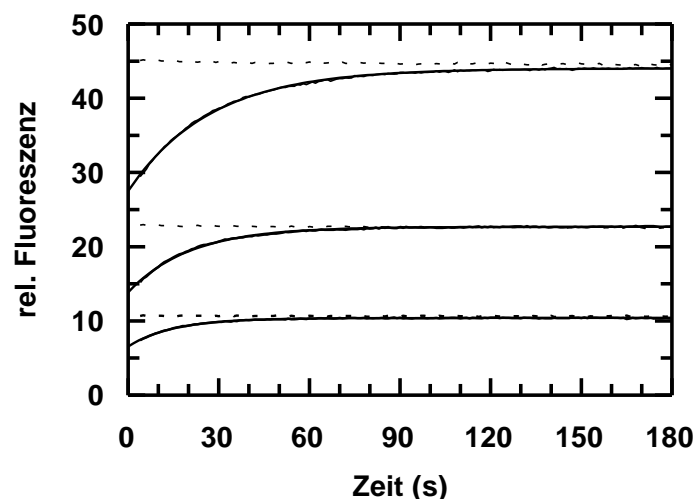


Abb. 3-20: Kinetik der Dissoziation des Komplexes aus 10 μM BADAN-TF R14C und 10 μM Ribosomen nach Verdünnung auf 200 nM, 100 nM und 50 nM (von oben nach unten; durchgezogene Linien). Die gestrichelten Linien zeigen die Verdünnung von 10 μM BADAN-TF R14C auf dieselben Endbedingungen in Abwesenheit von Ribosomen. Die Dissoziation des Komplexes wurde durch die Fluoreszenzzunahme bei 507 nm in 10 mM MgCl_2 , 6 mM β -Mercaptoethanol, 20 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 20°C mit Anregung bei 387 nm beobachtet. Der Angleich monoexponentieller Funktionen an die Daten (glatte Linie) ergab apparente Geschwindigkeitskonstanten von 0,037 s^{-1} , 0,049 s^{-1} und 0,063 s^{-1} für 200 nM, 100 nM und 50 nM.

3.1.7.4. Konzentrationsabhängigkeit der Bindungskinetik

Zur genaueren Analyse von Assoziationsreaktionen variiert man die Konzentrationen der Reaktanden. Bei Verwendung markierter Bindungspartner hält man üblicherweise die Konzentration der markierten Spezies konstant, während man die Konzentration des Reaktionspartners verändert. Idealerweise wählt man die Konzentrationen dieses Reaktionspartners deutlich höher als die des markierten Moleküls, um sich im kinetischen Bereich „pseudo-erster Ordnung“ zu bewegen, was die Auswertung der Daten erleichtert. Dies ist hier nicht möglich, da im vorliegenden Fall dann die Konzentration der Ribosomen im oberen mikromolaren Bereich

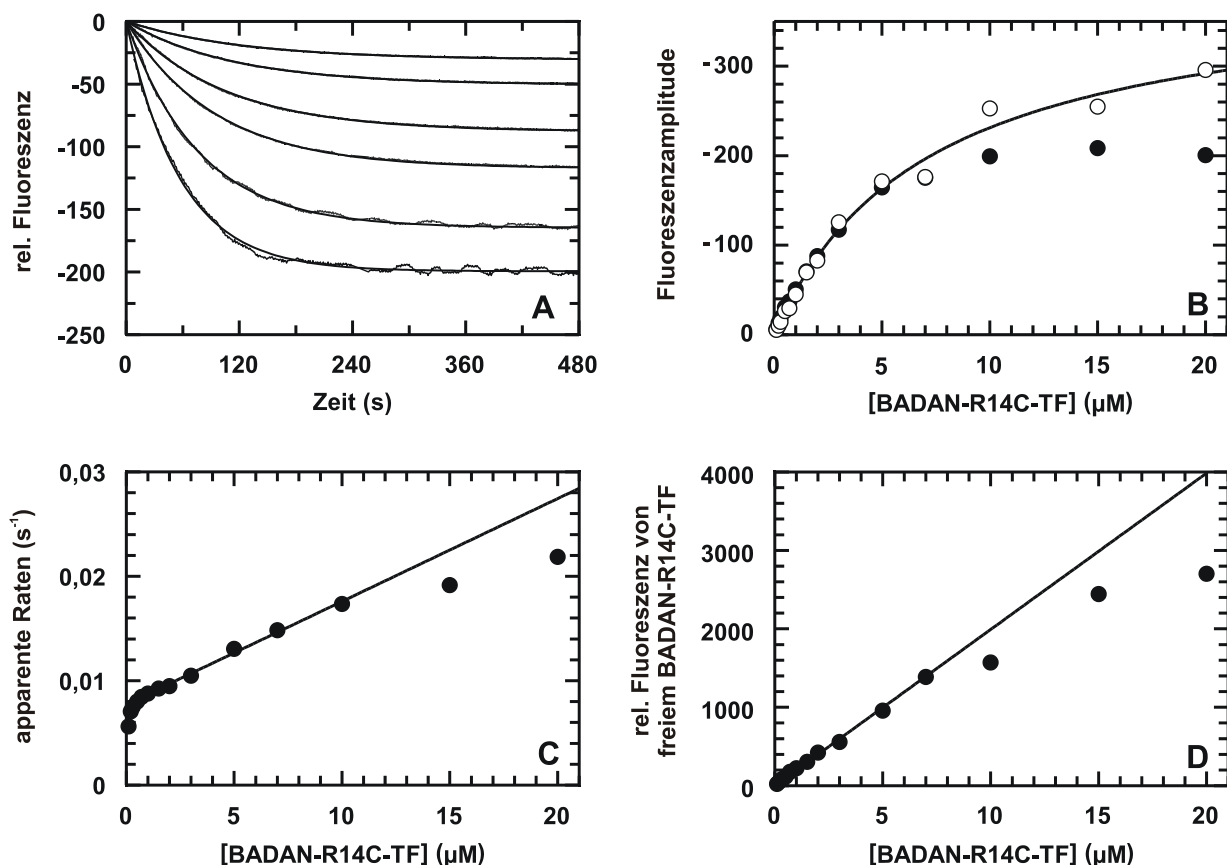


Abb. 3-21: Kinetik der Assoziation von fluoreszenzmarkiertem Trigger-Faktor mit Ribosomen.

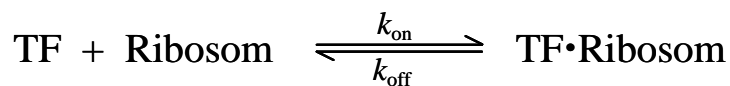
(A) Zeitlicher Verlauf der Assoziation von 2 µM Ribosomen mit (von oben nach unten) 0,5, 1, 2, 3, 5 und 10 µM BADAN-TF R14C anhand der Fluoreszenzzunahme bei 507 nm. An die Daten wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (glatte Linien) und die Fluoreszenzverläufe auf einen Startwert von null normiert. Die Messung erfolgte in 10 mM MgCl₂, 6 mM β-Mercaptoethanol, 20 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 20°C mit Anregung bei 387 nm. (B) Abhängigkeit der Amplituden der Assoziationsreaktion von der Konzentration an BADAN-TF R14C (●). Die Amplitudenwerte, die durch Korrektur des Inner-Filter-Effekts (vgl. Teilabbildung D) errechnet wurden, sind mit (○) dargestellt. Der Angleich einer hyperbolischen Bindungskurve an diese korrigierten Datenpunkte (durchgezogene Linie) ergibt einen apparenten K_D -Wert von 7,1 µM. (C) Abhängigkeit der apparenten Raten der Assoziation von der Konzentration an BADAN-TF R14C. Die durchgezogene Linie entspricht einer Datenanalyse für einen Einschritt-Bindungsmechanismus (Schema 3-6). Daraus ergeben sich Werte von $k_{on} = 0,0010 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und $k_{off} = 0,0077 \text{s}^{-1}$ und somit ein apparenter K_D -Wert von 7,7 µM. Datenpunkte im substöchiometrischen Bereich (0,1 - 1 µM BADAN-TF R14C) wurden für die Analyse nicht berücksichtigt. (D) Fluoreszenz von freiem BADAN-TF R14C als Funktion seiner Konzentration. Die Gerade zeigt die lineare Abhängigkeit bei niedrigen Konzentrationen in Abwesenheit des Inner-Filter-Effekts. Der Quotient aus den gemessenen und den erwarteten (aus der Geraden berechneten) Fluoreszenzwerten wurde benutzt, um die korrigierten Amplitudenwerte in Teilabbildung B zu berechnen.

gewählt werden müsste. Ribosomen sind jedoch sehr große Partikel, die Licht streuen und absorbieren – und dies auch noch im Wellenlängenbereich des hier verwendeten Anregungslichtes von 398 nm. Dadurch würde die Anregung des Fluorophors massiv beeinflusst, und somit ist der Bereich verwendbarer Ribosomenkonzentrationen auf maximal 5 μM beschränkt.

Aus diesem Grund wurde für die folgenden Assoziationsmessungen die Ribosomenkonzentration bei konstant 2 μM belassen, während die Konzentration an BADAN-TF R14C von 0,1 μM bis 20 μM variiert wurde. Abbildung 3-21 A zeigt exemplarisch die Fluoreszenzverläufe für sechs verschiedene Konzentrationen. Sie sind so normiert, dass ihre Fluoreszenzwerte zum Start der Messung bei null beginnen. Sowohl die Amplitude als auch die Rate der Assoziation steigen mit zunehmender Konzentration an Trigger-Faktor, und wie schon in Abbildung 3-19 A lassen sich alle Zeitverläufe gut durch monoexponentielle Kurven angleichen.

Die apparente Amplitude der Assoziation erreicht ein Maximum bei etwa 15 μM BADAN-TF R14C und sinkt dann wieder leicht ab (Abb. 3-21 B). Diese Abnahme resultiert aus dem so genannten „Inner-Filter-Effekt“: Die hohe Konzentration an Fluorophoren im Testansatz führt zu einer starken Absorption des Anregungslichtes. Das Ausmaß dieses Inner-Filter-Effekts wurde durch Messung der Fluoreszenz von BADAN-TF R14C-Lösungen in Abwesenheit von Ribosomen als Funktion der Konzentration an BADAN-TF R14C bestimmt (Abb. 3-21 D). Unterhalb von 10 μM nimmt dort die Fluoreszenz proportional zur eingesetzten Konzentration zu, darüber weicht sie deutlich von der Linearität ab. Das Ausmaß dieser Abweichung wurde verwendet, um die Amplitudenwerte in Abbildung 3-21 B zu normieren. Die durch diese Korrektur erhaltenen Amplitudenwerte folgen einer hyperbolischen Bindungskurve, aus der sich eine Dissoziationskonstante von 7,1 μM für den Komplex zwischen markiertem Trigger-Faktor und Ribosom errechnen lässt.

Abbildung 3-21 C zeigt die gemessenen Raten der Assoziation in Abhängigkeit von der Konzentration an BADAN-TF R14C. Bei einem Einschritt-Bindungsmechanismus (Schema 3-6) sollte unter Versuchsbedingungen „pseudo-erster Ordnung“ diese Auftragung eine lineare Konzentrationsabhängigkeit zeigen.



Schema 3-6: Einstufiges Modell für die Komplexbildung von Ribosom und Trigger-Faktor.

Dabei entspricht die Steigung der Geraden der Assoziationsrate k_{on} und der Ordinaten-schnittpunkt der Dissoziationsrate k_{off} . Für Konzentrationen zwischen 2 und 10 μM folgen die Daten näherungsweise diesem Einschrittmodell, wobei die lineare Analyse Werte von $k_{\text{on}} = 0,0010 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} = 0,0077 \text{ s}^{-1}$ ergibt. Aus dem Quotienten dieser Werte lässt sich

eine Dissoziationskonstante von $7,7 \mu\text{M}$ errechnen, welche sehr gut mit dem aus der Amplitudenanalyse (Abb. 3-21 B) ermittelten Wert übereinstimmt. Oberhalb von $10 \mu\text{M}$ weichen die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten deutlich vom linearen Verhalten ab. Dieses Verhalten ist typisch für ein Zweischnittbindungsmodell (vgl. Schema 3-1 für die Assoziation von Trigger-Faktor und Lactalbumin). Dabei folgt der primären Assoziation der Komplexpartner eine nachgelagerte strukturelle Veränderung, welche ganz oder teilweise für die beobachtete Fluoreszenzänderung verantwortlich ist. Weiterhin wäre es möglich, dass die Dimerisierung (vgl. Abschnitt 3.1.4.) und die weitere Tendenz zur Selbstassoziation des Trigger-Faktors bei höheren Konzentrationen (vgl. Abschnitt 3.1.7.5.) die Abweichung von der Linearität bewirken.

3.1.7.5. Verdrängung des markierten Trigger-Faktors vom Ribosom durch Wildtyp-Trigger-Faktor

Wie schon in Abbildung 3-19 B gezeigt, konkurrieren die fluoreszenzmarkierte und die unmarkierte Form des Trigger-Faktors um die Bindung am Ribosom, so dass der markierte Trigger-Faktor aus einem bestehenden Komplex mit dem Ribosom durch Zugabe von unmarkiertem Trigger-Faktor verdrängt werden kann.

In den folgenden Experimenten wurde der Komplex durch Inkubation von jeweils $2 \mu\text{M}$ BADAN-TF R14C und Ribosomen bis zur Gleichgewichtseinstellung vorgebildet. Anschließend wurde die Verdrängung durch Zugabe von unmarkiertem Trigger-Faktor in verschiedenen Konzentrationen gestartet (Abb. 3-22 A). Die Freisetzung von BADAN-TF R14C zeigt sich anhand der Zunahme der BADAN-Fluoreszenz und, wie erwartet, steigt die Amplitude dieser Fluoreszenzänderung mit der Konzentration an unmarkiertem Trigger-Faktor (Abb. 3-22 B).

Bei hohen Konzentrationen sinkt diese Amplitude allerdings wieder, was vermutlich aus einer Wechselwirkung zwischen markiertem und unmarkiertem Trigger-Faktor resultiert. Diese Wechselwirkung kann man beobachten, wenn man beide Formen des Trigger-Faktors in Abwesenheit von Ribosomen miteinander mischt: Bei Zugabe steigender Konzentrationen an unmarkiertem Trigger-Faktor zu jeweils $2 \mu\text{M}$ BADAN-TF R14C sinkt die BADAN-Fluoreszenz (Abb. 3-22 D). Allerdings ist diese angenommene Wechselwirkung so schwach, dass selbst bei $150 \mu\text{M}$ Trigger-Faktor noch keine vollständige Sättigung zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt). Die Fluoreszenzabnahme aus dieser TF-TF-Wechselwirkung ist der Fluoreszenzzunahme bei der Freisetzung von BADAN-TF R14C aus dem Ribosomenkomplex entgegengerichtet und bewirkt so die scheinbar geringere Verdrängungsamplitude bei hohen Trigger-Faktor-Konzentrationen. Die Daten aus Abbildung 3-22 D wurden daher zur Korrektur der Amplitudenwerte in Abbildung 3-22 B verwendet.

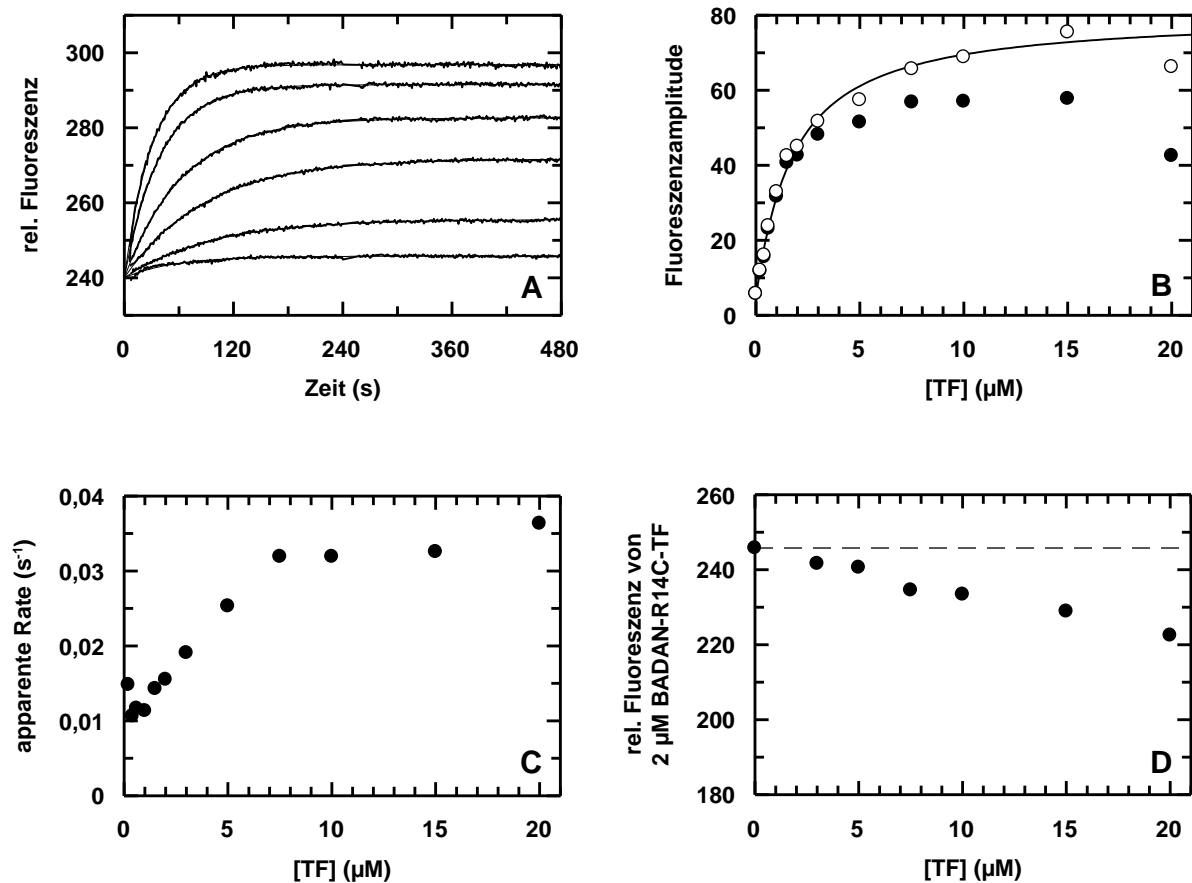


Abb. 3-22: Kinetik der Verdrängung von fluoreszenzmarkiertem Trigger-Faktor aus dem Komplex mit Ribosomen durch unmarkierten Trigger-Faktor.

(A) Zeitlicher Verlauf der Verdrängung von 2 μM fluoreszenzmarkiertem BADAN-TF R14C aus dem vorgebildeten Komplex mit 2 μM Ribosomen durch Zugabe von (von unten nach oben) 0, 0,4, 1, 2, 5 und 10 μM unmarkiertem Trigger-Faktor, beobachtet anhand der Fluoreszenzzunahme bei 507 nm. An die Daten wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (glatte Linien). Die Messung erfolgte in 10 mM MgCl_2 , 6 mM β -Mercaptoethanol, 20 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 20°C mit Anregung bei 387 nm. (B) Abhängigkeit der Amplituden der Verdrängungsreaktion von der Konzentration an zugegebenem unmarkiertem Trigger-Faktor (●). Die Amplitudenwerte, die durch Korrektur des Assoziationseffekts zwischen markiertem und unmarkiertem Trigger-Faktor (vgl. Teilabbildung D) errechnet wurden, sind mit (○) dargestellt. Der Angleich einer Kurve für kompetitive Bindung an diese korrigierten Datenpunkte (durchgezogene Linie) ergibt einen apparenten K_D -Wert von 1,1 μM für die Bindung zwischen unmarkiertem Trigger-Faktor und Ribosomen. (C) Abhängigkeit der apparenten Raten der Verdrängungsreaktion von der Konzentration an unmarkiertem Trigger-Faktor. (D) Fluoreszenz nach Mischung von 2 μM freiem BADAN-TF R14C mit verschiedenen Konzentrationen an unmarkiertem Wildtyp-TF. Die Differenz zwischen gemessener Fluoreszenz und der Fluoreszenz des freien BADAN-TF R14C (gestrichelte Linie) wurde zur Berechnung der korrigierten Amplitudenwerte in Teilabbildung B benutzt.

Die so erhaltenen korrigierten Amplituden wurden dann ausgewertet unter der Annahme, dass der markierte und der unmarkierte TF um dieselbe Bindungsstelle am Ribosom konkurrieren. Aus dieser Analyse ergibt sich eine Dissoziationskonstante von 1,1 μM für den Komplex zwischen Wildtyp-Trigger-Faktor und Ribosom.

Zur Kontrolle wurde dieses konzentrationsabhängige Verdrängungsexperiment auch mit der nicht ribosomenbindenden unmarkierten Variante TF FRK/AAA durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Selbst bei einer Konzentration von 35 μM war dieser TF FRK/AAA nicht in der Lage, BADAN-TF R14C aus dem Komplex mit dem Ribosom zu verdrängen.

Eine zu beobachtende minimale Fluoreszenzzunahme von ca. 1 % bei diesen Messungen (vgl. Abb. 3-19 B, rote Kurve) ist auf eine durch die Verdünnung des Testansatzes bei Zugabe von TF FRK/AAA hervorgerufene schwache Dissoziation des markierten Trigger-Faktor-Ribosomen-Komplexes zurückzuführen. Diese Interpretation wird dadurch gestützt, dass die beobachtete schwache Fluoreszenzzunahme unabhängig ist von der Konzentration an TF FRK/AAA. Sie kann ebenso durch Zupipettieren des äquivalenten Volumens an reinem Messpuffer erreicht werden (vgl. Abb. 3-19 B, schwarze Kurve). Bei Zugabe von mehr als 10 μM TF FRK/AAA sinkt die Fluoreszenz sogar leicht. Dies ist auf die oben erwähnte schwache Wechselwirkung zwischen markiertem und unmarkiertem Trigger-Faktor zurückzuführen: Genauso wie Wildtyp-Trigger-Faktor führt die Zugabe von TF FRK/AAA zu BADAN-TF R14C in Abwesenheit von Ribosomen zu einer konzentrationsabhängigen Fluoreszenzabnahme (Daten nicht gezeigt). Auch in den Verdrängungsexperimenten zeigt sich also, dass das Motiv Phe 44, Arg 45, Lys 46 essentiell ist für die Bindung des Trigger-Faktors an die große Untereinheit des Ribosoms.

Abbildung 3-22 C zeigt die Raten für die Verdrängung von BADAN-TF R14C aus dem Ribosomenkomplex als Funktion der eingesetzten Konzentration an unmarkiertem Wildtyp-Trigger-Faktor. Der Wert, der dabei asymptotisch bei hohen Konzentrationen erreicht wird, sollte die mikroskopische Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Komplexes aus Ribosom und fluoreszenzmarkiertem Trigger-Faktor widerspiegeln. Tatsächlich stimmt der Wert von $0,036 \text{ s}^{-1}$ gut mit den Dissoziationsraten überein, die aus der Verdünnung des Trigger-Faktor-Ribosomen-Komplexes erhalten wurden (Abb. 3-20).

Die Lebenszeit des Komplexes aus Trigger-Faktor und Ribosom beträgt also bei 20°C etwa 30 s. Auch wenn diese Zeitspanne bei 37°C etwas kürzer sein dürfte, reicht die Verweildauer des Trigger-Faktors am Ribosom doch für die Synthese vieler Peptidbindungen und sogar vollständiger Proteinketten aus. Da sich die Bindungsenergien für die Wechselwirkung des Trigger-Faktors mit dem Ribosom und mit der naszierenden Kette näherungsweise additiv verhalten sollten, dürfte der ternäre Komplex aus Trigger-Faktor, Ribosom und naszierender Kette so lange stabil sein, wie auch die naszierende Kette noch mit dem Ribosom verbunden ist. Im Gegensatz dazu ist die Wechselwirkung des Trigger-Faktors mit Substratproteinen - und somit wohl auch den naszierenden Ketten - sehr viel dynamischer mit Komplexlebensdauern von etwa 100 ms (bei 15°C , vgl. Abschnitt 3.1.1.), was der Synthese von nur wenigen Peptidbindungen entspricht. Diese unterschiedlichen Dynamiken erlauben dem Trigger-Faktor während der Synthese einer Proteinkette am Ribosom gebunden zu bleiben und die naszierende Kette immer wieder zu binden und loszulassen. Auf diese Weise wird die naszierende Kette effizient vor unerwünschten Wechselwirkungen mit anderen ungefalteten Proteinketten abgeschirmt und somit eine Aggregation vermieden. Außerdem wird so eine vorzeitige Faltung unvollständiger Proteindomänen verhindert und der Trigger-Faktor kann bereits während der Proteinsynthese die wachsende Peptidkette schnell und

effizient nach Prolylbindungen „absuchen“, an denen eine *cis-trans*-Isomerisierung katalysiert werden muss.

Nach vollständiger Synthese kann sich das neue Protein dann durch schnelle Faltung der erneuten Bindung durch Trigger-Faktor entziehen und dieser kann während einer weiteren Proteinsynthese am Ribosom verbleiben. Ist das neu synthetisierte Protein zu einer schnellen Faltung nicht fähig, kann TF das Ribosom zusammen mit dem zu faltenden Protein verlassen und in weiteren Bindungs- und Katalyseschritten dieses abschirmen und seine Faltung im Cytosol ermöglichen. Die TF-Bindungsstelle am Ribosom wäre damit frei für die Bindung eines anderen Trigger-Faktormoleküls.

Die Affinität zwischen Trigger-Faktor und Ribosom scheint bei Dissoziationskonstanten von 1 μM bzw. 7 μM für unmarkierten bzw. markierten TF relativ gering zu sein. Führt man sich jedoch vor Augen, dass die zelluläre Konzentration an Ribosomen etwa 20 μM (Gouy & Grantham 1980; Lill *et al.* 1988) und an TF 35-50 μM beträgt (Göthel *et al.* 1998; Teter *et al.* 1999), so folgt daraus, dass *in vivo* doch über 90 % aller Ribosomen mit TF besetzt sein sollten. Überschüssiger Trigger-Faktor, der gerade nicht als Faltungshelfer aktiv ist, bildet dann Dimere (vgl. Abschnitt 3.1.4.). Diese Dimere dienen dabei als „Speicherform“ des Trigger-Faktors. So wird sichergestellt, dass bei Bedarf genügend Trigger-Faktor zur Verfügung gestellt werden kann, dass aber andererseits nicht eine hohe Konzentration freier TF-Monomere im Cytosol eine permanente Bindung ungefalteter Proteinketten und somit eine Faltungsverlangsamung oder gar -blockade bewirkt.

3.1.7.6. Ribosomenbindung von Trigger-Faktor mit Fluoreszenzmarkierung an Position 30

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Einführen einer Punktmutation wie R14C oder die Gegenwart eines Fluoreszenzfarbstoffes die Eigenschaften des Trigger-Faktors beeinflussen. So wurde bereits oben erwähnt, dass die Markierung mit BADAN die spezifische Aktivität von TF R14C um etwa 60 % reduziert. Weiterhin fällt auf, dass für die Assoziation von BADAN-TF R14C und Ribosomen ein K_D von 7,1 μM gemessen wurde, während sich aus den Verdrängungsexperimenten für den Wildtyp-Trigger-Faktor ein K_D von 1,1 μM ergab. Die Fluoreszenzmarkierung an Position 14 beeinflusst also offenbar die Bindung des Trigger-Faktors ans Ribosom und an Proteinsubstrate. Aus diesem Grund sollten die obigen Ergebnisse durch Einführen einer Fluoreszenzmarkierung an anderer Stelle im Trigger-Faktor überprüft werden.

Die Position 30 im Trigger-Faktor bietet sich als Markierungsstelle an, da der konservative Aminosäureaustausch von Serin30 zu Cystein das Protein möglichst wenig in seinen Bindungseigenschaften beeinflussen sollte.

Der resultierende TF S30C wurde unter reduzierenden Bedingungen gereinigt. Seine katalytische Effizienz im RCM-T1-Rückfaltungstest lag mit $9,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ im Bereich des Wildtypproteins. Wie die R14C-Variante ließ sich auch TF S30C gut am eingeführten Cystein mit BADAN modifizieren. Allerdings sank die spezifische Aktivität des Enzyms durch Einführen der Fluoreszenzmarkierung um ca. 75 % auf $2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Daten nicht gezeigt).

Bei Mischung von 2 μM BADAN-TF S30C mit 2 μM Ribosomen zeigt sich eine ähnliche Fluoreszenzabnahme (Abb. 3-23 A, blaue Kurve) wie beim entsprechenden Experiment mit BADAN-TF R14C (vgl. Abb. 3-19 A). Allerdings verläuft diese Reaktion mit einer Zeitkonstanten von 3,2 s und somit etwa dreißigmal schneller als bei der markierten R14C-Variante. Die „Negativkontrolle“ bei Mischung von BADAN-TF S30C FRK/AAA mit Ribosomen zeigt erwartungsgemäß keine signifikante Fluoreszenzänderung (Abb. 3-23 A, rote Kurve).

Der große Unterschied der Ribosomenassoziationsraten der beiden markierten TF-Varianten lässt mehrere verschiedene Interpretationen zu:

1. Beide Fluoreszenzverläufe beschreiben den zeitlichen Verlauf der spezifischen Bindung der jeweiligen Variante ans Ribosom. Die Assoziationsgeschwindigkeiten der beiden Varianten sind also tatsächlich so sehr verschieden.
2. Die schnelle Fluoreszenzabnahme im Falle von BADAN-TF S30C beschreibt den tatsächlichen Assoziationsverlauf zutreffender. Im Falle von BADAN-TF R14C verläuft die Assoziation zwar ähnlich schnell, aber erst eine nachfolgende langsame strukturelle Umlagerung bewirkt die beobachtete Fluoreszenzänderung.
3. In mindestens einem Fall bildet die Fluoreszenzabnahme nicht die spezifische Bindung des Trigger-Faktors am L23-Protein des Ribosoms ab, sondern eine unspezifische Wechselwirkung zwischen dem fluoreszenzmarkierten Protein (bzw. dem Fluorophor selbst) und dem Ribosom.

Eine unspezifische Wechselwirkung gemäß der letztgenannten Möglichkeit erscheint auf den ersten Blick eher unwahrscheinlich, da ja bei beiden Negativkontrollen mit den BADAN-markierten FRK/AAA-Varianten keine Fluoreszenzänderung zu beobachten war (Abb. 3-19 A und 3-23 A, blaue Kurven).

Anders stellt sich die Situation jedoch dar, wenn man die Verdrängung des fluoreszenzmarkierten Trigger-Faktors aus dem Komplex mit dem Ribosom betrachtet (Abb. 3-23 B). Erwartungsgemäß steigt nach Zugabe von unmarkiertem TF zum vorgebildeten Komplex aus BADAN-TF S30C und Ribosomen die Fluoreszenz an (blaue Kurve). Diese Verdrängungsreaktion ist so schnell, dass sie in einem Handmischungsexperiment kaum aufzulösen ist. Erstaunlicherweise steigt hier die Fluoreszenz aber ebenfalls nach Zugabe des nicht riboso-

menbindenden TF FRK/AAA (rote Kurve). Auch hier erfolgt die Fluoreszenzzunahme innerhalb der Totzeit der Messung, während sich nachgelagert eine schwache Fluoreszenzabnahme anschließt.

Aufgrund der hohen Geschwindigkeit der Reaktionen und der fehlenden Auflösung während der ersten Sekunden wurden sowohl die Assoziations- als auch die Verdrängungsmessungen von BADAN-TF S30C im Stopped-Flow-Fluorimeter wiederholt (Abb. 3-23 C, D). Die dort gewonnenen Resultate bestätigten voll diejenigen der Handmischungsexperimente. Insbesondere zeigte sich, dass im Verdrängungsexperiment die Fluoreszenz von BADAN-TF S30C bei Zugabe von unmarkiertem WT-TF und TF FRK/AAA zum vorgebildeten Komplex innerhalb einer Sekunde nahezu identisch ansteigt.

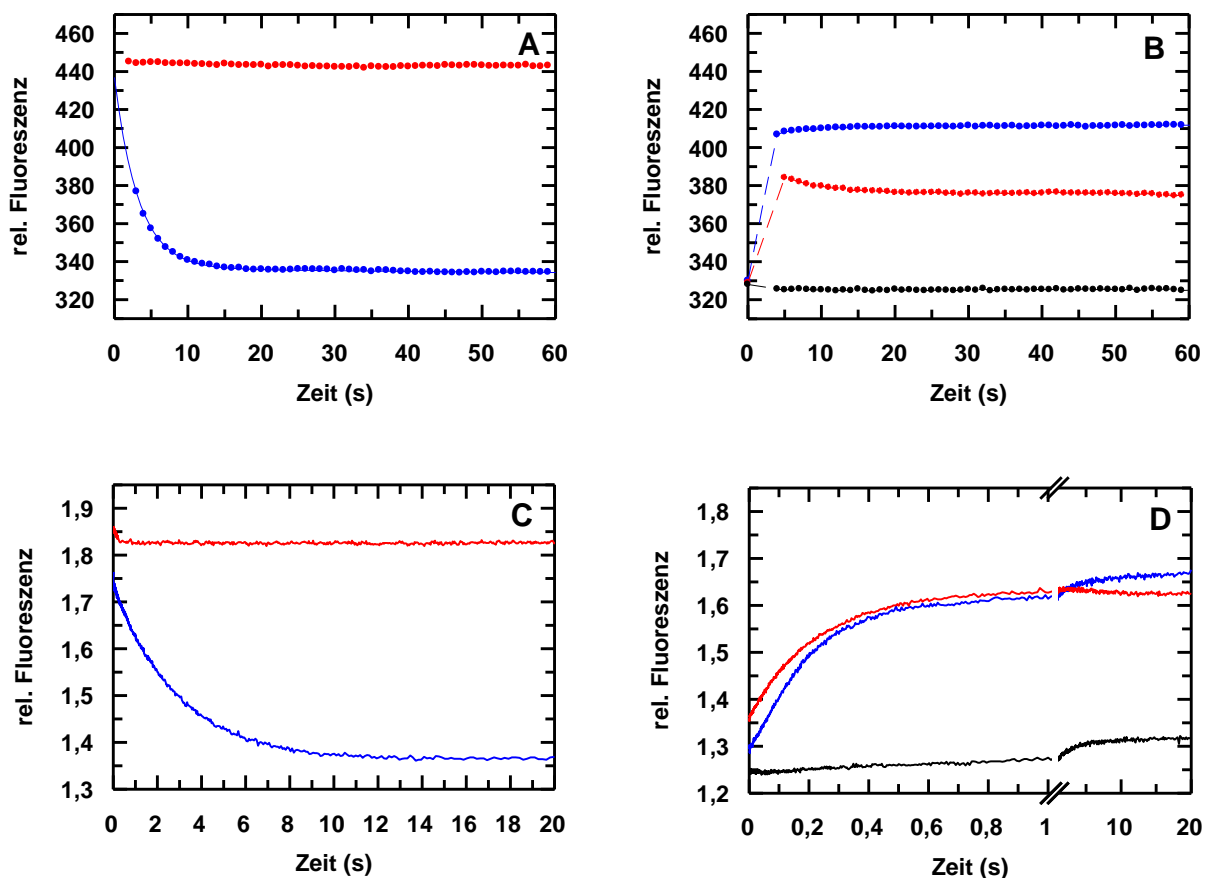


Abb. 3-23: (A, C) Kinetik der Assoziation von fluoreszenzmarkiertem Trigger-Faktor mit Ribosomen. Fluoreszenzabnahme nach Mischung von 2 μM BADAN-TF S30C mit 2 μM Ribosomen (\bullet bzw. $—$). Die glatte Linie zeigt den Angleich einer monoexponentiellen Funktion mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $0,31\text{ s}^{-1}$ an die Daten. Im Kontrollexperiment wurden 2 μM BADAN-TF S30C FRK/AAA mit 2 μM Ribosomen gemischt (\bullet bzw. $—$). **(B, D) Kinetik der Verdrängung von BADAN-TF S30C vom Ribosom.** Ein Komplex aus 2 μM BADAN-TF R14C und 2 μM Ribosomen wurde bis zur Gleichgewichtseinstellung vorgebildet und dann mit 2 μM unmarkiertem Wildtyp-Trigger-Faktor ($—$) bzw. 2 μM TF FRK/AAA ($—$) gemischt. Die untere Kurve ($—$) zeigt zur Kontrolle den Fluoreszenzverlauf nach Zugabe eines äquivalenten Volumens an reinem Messpuffer. Sämtliche Messungen erfolgten in 10 mM MgCl_2 , 6 mM β -Mercaptoethanol, 20 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 20°C mit Anregung bei 387 nm. (A) und (B) zeigen die Fluoreszenz bei 507 nm nach Handmischung im Fluorimeter, (C) und (D) die integrale Fluoreszenz oberhalb 460 nm nach Mischung im Stopped-Flow-Fluorimeter.

Sowohl WT-TF als auch TF FRK/AAA scheinen also gleichermaßen in der Lage, den markierten BADAN-TF S30C aus dem Komplex mit dem Ribosom zu verdrängen. Da aber TF FRK/AAA nicht spezifisch an Ribosomen binden kann, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch der verdrängte BADAN-TF S30C nicht spezifisch an seiner Bindungsstelle am L23-Protein des Ribosoms gebunden hat. Dies deutet darauf hin, dass doch die oben diskutierte Interpretation zutrifft, dass das Fluoreszenzsignal bei Mischung von BADAN-TF S30C und Ribosomen auf einer unspezifischen Wechselwirkung mit dem Ribosom beruht. Die Variante BADAN-TF S30C scheint daher nicht das geeignete Protein zur Untersuchung der spezifischen Wechselwirkung von Trigger-Faktor und Ribosom zu sein.

Die hier geschilderten Befunde zeigen, wie wichtig die jeweiligen Negativkontrollen sind, um die Aussagekraft eines Experiments einschätzen zu können. Die Messungen mit der Variante BADAN-TF S30C konnten daher die in sich schlüssigen Ergebnisse, die mithilfe der Variante BADAN-TF R14C erzielt wurden, leider nicht bestätigen, sie allerdings auch keinesfalls widerlegen. Allem Anschein nach ist die Ribosomenbindung des Trigger-Faktors also tatsächlich ein relativ langsamer Prozess, der sich im Bereich mehrerer Sekunden abspielt.

3.1.8. Der Trigger-Faktor aus *Thermotoga maritima*

Trigger-Faktor kommt in allen Eubakterien vor. Selbst das (bezogen auf die Genomgröße) kleinste freilebende Bakterium, *Mycoplasma genitalium*, „leistet“ sich ein *tig*-Gen. Allerdings konnte bislang nur in einem einzigen Organismus ein starker Effekt bei Eliminierung des Trigger-Faktors gefunden werden. Fraglich ist auch, ob die Hauptaufgabe des Trigger-Faktors in seiner Chaperonaktivität oder seiner Prolylisomeraseaktivität liegt. Insbesondere bei höheren Temperaturen sollte die unkatalysierte Isomerisierung von Peptidyl-Prolylbindungen schnell genug ablaufen, so dass zur korrekten Proteinfaltung die Hilfe einer Prolylisomerase nicht nötig sein sollte. Tatsächlich zeigt sich die Bedeutung des Trigger-Faktors daher auch eher bei niedrigen Temperaturen. Beispielsweise wird in *B. subtilis* die Konzentration an TF nach einem Temperatursprung von 37°C auf 15°C verdoppelt (Göthel *et al.* 1998), und *E. coli* *Atig* Zellen zeigen bei langer Lagerung in Kälte eine deutlich erniedrigte Überlebensrate (Kandror & Goldberg 1997).

Vor diesem Hintergrund schien es interessant, ob Trigger-Faktor aus einem extrem thermophilen Bakterium auch noch Prolylisomeraseaktivität zeigt oder ob er sich auf seine Chaperonfunktion beschränkt. Als Versuchsobjekt wurde der Trigger-Faktor aus *Thermotoga maritima* (*TmTF*) ausgewählt. Dieses Eubakterium, das erstmals aus geothermisch erhitztem Meeressediment nahe der Mittelmeerinsel Vulcano isoliert wurde, hat eine optimale Wachstumstemperatur von 80°C.

Leider steht derzeit kein geeignetes Isomerase-Testsystem für derart hohe Temperaturen zur Verfügung. Somit wurde die Isomeraseaktivität zunächst unter Standardbedingungen, d.h. bei 15°C, sowohl im RCM-T1-Rückfaltungstest (Abb. 3-24) als auch im proteasegekoppelten Peptidtest (Daten nicht gezeigt) untersucht.

Die Beschleunigung durch *TmTF* fiel äußerst gering aus und es ließen sich katalytische Effizienzen k_{cat}/K_M von lediglich $1,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ im RCM-T1-Rückfaltungstest und von $1,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ im Peptidtest ermitteln. Diese Werte sind ungefähr tausendfach niedriger als die von *E. coli* Trigger-Faktor (*EcTF*), der in beiden Testsystemen eine katalytische Effizienz von ca. $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ zeigt (Stoller *et al.* 1996; Scholz *et al.* 1997b).

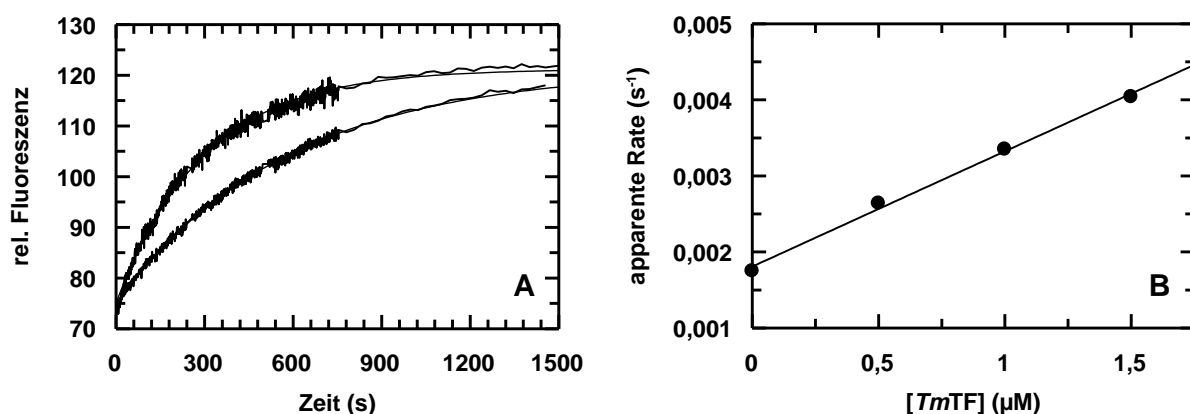


Abb. 3-24: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch *TmTF*. (A) Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von 2,0 µM RCM-T1 in Abwesenheit (untere Kurve) und Gegenwart (obere Kurve) von 1,0 µM *TmTF*. Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. RCM-T1 wurde bei 15°C in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 2,0 µM RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven). (B) Abhängigkeit der apparenten Raten der Rückfaltung von RCM-T1 von der *T. maritima* Trigger-Faktor-Konzentration. Aus der Steigung der Regressionsgeraden resultiert eine Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M von $1,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die katalytische Effizienz des *TmTF*.

Auf den ersten Blick mag es also tatsächlich so erscheinen, als ob *TmTF* im Laufe der Evolution seine Katalyseaktivität nahezu vollständig verloren hätte. Allerdings muss man bedenken, dass dieser Trigger-Faktor ja auch noch bei Temperaturen oberhalb von 80°C strukturell intakt sein muss. Dies setzt eine hohe thermische Stabilität voraus und lässt erahnen, dass das Enzym bei 15°C sehr starr und unflexibel sein dürfte, was eine gute Katalyse erschwert oder gar verhindert.

Daher wurde es notwendig, ein neues Testsystem zu etablieren, das die Messung von Prolylisomeraseaktivität auch noch bei höheren Temperaturen als 15°C erlaubt. Aus diesem Grund wurde für weitere Versuche anstelle der reduzierten und carboxymethylierten Form der S54G/P55N-Variante von Ribonuklease T1 (RCM-T1) nun die carbamidomethylierte Form

von Ribonuklease T1(4X) (RCAM-T1(4X)) verwendet. Diese von Volker Sieber mit Hilfe der PROSIDE-Methode gewonnene stabilisierte Variante enthält zusätzlich zu der Mutation S54G/P55N die drei Mutationen S17A, D29N und Y42F, welche das Protein um etwa 10 kJ/mol im Vergleich zur RNase T1(S54G/P55N) stabilisieren (Sieber 1998). Außerdem wurde die Modifikation des Proteins nach reduktivem Öffnen der Disulfidbrücken mit Iodacetamid statt mit Iodacetat durchgeführt. Dadurch wurden die Thiolgruppen der Cysteine mit ungeladenen Carbamidomethylgruppen modifiziert. Diese führen anders als die negativ geladenen Carboxymethylgruppen nicht zu einer Destabilisierung aufgrund elektrostatischer Abstoßung.

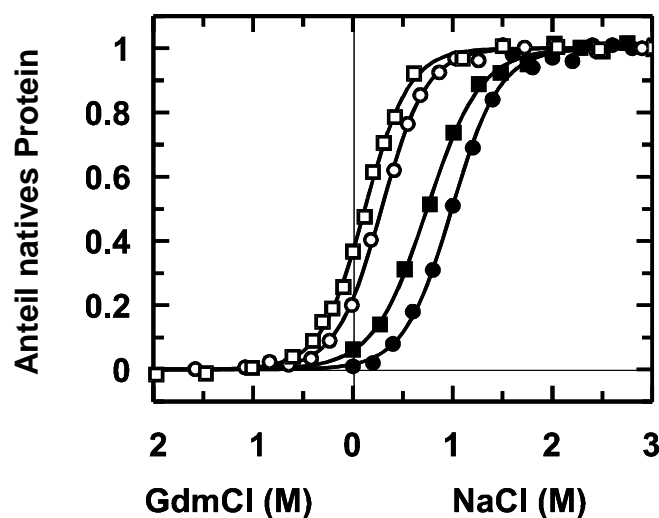


Abb. 3-25: NaCl- bzw. GdmCl-induzierte Faltungsübergänge verschiedener disulfidfreier Varianten von RNase T1. Gezeigt sind Übergangskurven von RCAM-T1(4X) (\square), RCAM-T1(3X) (\circ), RCAM-T1 (\blacksquare) und RCM-T1 (\bullet). Aufgetragen ist der Anteil an gefaltetem Protein als Funktion der Konzentration an NaCl bzw. GdmCl. Die Proteinkonzentration war 1 μ M. Die Faltung wurde anhand der Änderung der Fluoreszenzemission bei 320 nm nach Anregung bei 278 nm in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C verfolgt. Die Abbildung ist (Sieber 1998) entnommen.

Während der Mittelpunkt des NaCl-induzierten Faltungsübergangs bei pH 8,0 und 15°C (Abb. 3-25) von RCM-T1 bei 1,0 M NaCl liegt, liegt dieser für RCAM-T1(4X) bei 0,12 M (Sieber 1998). Außerdem konnte Volker Sieber zeigen, dass die Stabilität von RCAM-T1(4X) noch weiter zunimmt, wenn man pH 6,0 statt 8,0 wählt (Sieber, nicht veröffentlichte Ergebnisse). Aus diesem Grund wurden die weiteren Rückfaltungstests für *TmTF* bei 3,0 M NaCl und pH 6,0 mit RCAM-T1(4X) als Faltungssubstrat durchgeführt. Das ermöglichte zwar noch keine Messungen bei der für *Thermotoga maritima* physiologischen Temperatur von 80°C, aber nun zumindest bei 35°C (Abb. 3-26).

Die Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M für die katalytische Effizienz der Trigger-Faktoren aus *T. maritima* und *E. coli* sind in Tabelle 3-1 für verschiedene Temperaturen angegeben. Im Ver-

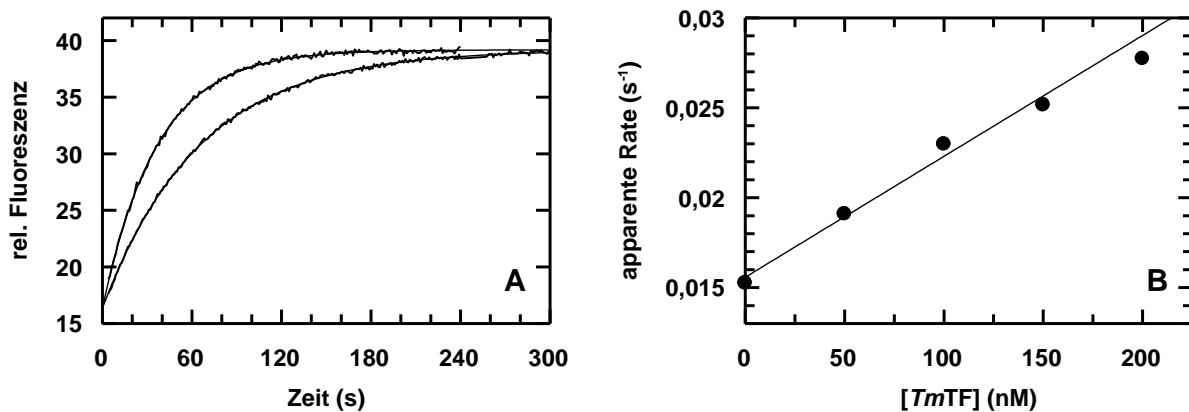


Abb. 3-26: Katalyse der Rückfaltung von RCAM-T1(4X) durch *TmTF*. (A) Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von 500 nM RCAM-T1(4X) in Abwesenheit (untere Kurve) und Gegenwart (obere Kurve) von 200 nM *TmTF*. Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. RCAM-T1(4X) wurde bei 35°C in 100 mM MES pH 6,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 500 nM RCAM-T1(4X) in 3,0 M NaCl, 100 mM MES pH 6,0 bei 35°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven). (B) Abhängigkeit der apparenten Raten der Rückfaltung von RCAM-T1(4X) von der *TmTF*-Konzentration. Aus der Steigung der Regressionsgeraden resultiert eine Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M von $6,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die katalytische Effizienz des *TmTF*.

gleich zum *E. coli* Protein ist die Aktivität des *TmTF* auch bei 35°C noch zehnfach geringer. Es fällt jedoch auf, dass dessen Aktivität mit jeder Temperaturerhöhung um 10 K ungefähr um Faktor 6 zunimmt. Höhere Temperaturen sind für die Messung nicht zugänglich. Die Vermutung liegt nahe, dass sich die Aktivität des *TmTF* bei weiterer Temperaturerhöhung auch noch weiter steigern würde, so dass auch dieser Aktivitätswerte vergleichbar mit denen des *EcTF* erreichen dürfte.

Tabelle 3-1: Prolylisomeraseaktivität von *TmTF* und *EcTF* im RCAM-T1(4X) Rückfaltungstest

Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	15°C	25°C	35°C
<i>TmTF</i>	1.700	10.700	68.000
<i>EcTF</i>	520.000	1.200.000	670.000

Gemessen wurde die Enzymaktivität bei der Rückfaltung von 100 nM RCAM-T1(4X) (*EcTF*) bzw. 500 nM RCAM-T1(4X) (*TmTF*) in 3,0 M NaCl, 100 mM MES pH 6,0 (vgl. Abb. 3-26).

Allerdings ist zu bedenken, dass sich auch die Rate der langsamen Phase der unkatalysierten Rückfaltung, also die spontane Isomerisierungsrate, bei der Temperaturerhöhung von 15°C auf 35°C von $0,0015 \text{ s}^{-1}$ auf $0,015 \text{ s}^{-1}$ verzehnfacht (Daten nicht gezeigt). Die oben geäußerte Vermutung, dass bei sehr hohen Temperaturen die spontane Isomerisierung so schnell sein sollte, dass es dort eigentlich keiner Prolylisomerasen mehr bedarf, wird durch diese Beobachtung ebenfalls gestützt. Vielleicht wird die Isomerasefunktion des *TmTF* eben gerade dann be-

nötigt, wenn sich das Bakterium einmal in einer kälteren Umgebung befindet und seine hoch thermostabilen Proteine besonders starr und unbeweglich werden. Wie stark sich niedrige Temperaturen auf alle Prozesse in *T. maritima* auswirken, zeigt sich besonders deutlich in der Tatsache, dass diese Spezies nicht in der Lage ist, bei Temperaturen unterhalb von 55°C zu wachsen (Huber *et al.* 1986).

Ein Hauptgrund für die Zunahme der Isomeraseaktivität von *TmTF* bei steigender Temperatur könnte – wie schon weiter oben angedeutet – in einer höheren Flexibilität des bei niedrigen Temperaturen sehr „starren“ thermostabilen Enzyms liegen. Durchaus denkbar wäre es daher, dass man eine ähnliche Aktivitätssteigerung auch durch Zugabe chaotroper Substanzen wie Guanidiniumchlorid (GdmCl) zum *TmTF* erreichen könnte, da dadurch auch ein „Aufweichen“ der starren Proteinstruktur bewirkt werden sollte. Allerdings kann eine derartige Aktivierung im proteasegekoppelten Peptidtest in Gegenwart steigender Konzentrationen an GdmCl nicht beobachtet werden. Oberhalb von 2 M GdmCl nimmt die Aktivität des *TmTF* sogar ab (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch wichtig zu bedenken, dass eine durch Wärmezufuhr erreichte höhere Flexibilität eines Proteins nicht mit einem „Aufweichen“ der Proteinstruktur durch GdmCl gleichzusetzen ist. Somit konnte also die Vermutung, dass die geringe Aktivität des *TmTF* bei niedrigen Temperaturen tatsächlich an seiner starren Struktur liegt, durch die Tests mit GdmCl nicht unterstützt, aber auch nicht widerlegt werden.

Bei hohen Temperaturen wie 80°C dürfte sicherlich die Chaperonfunktion des Trigger-Faktors aus *T. maritima* dominieren. Aus diesem Grund wurde ein Aggregationstest mit

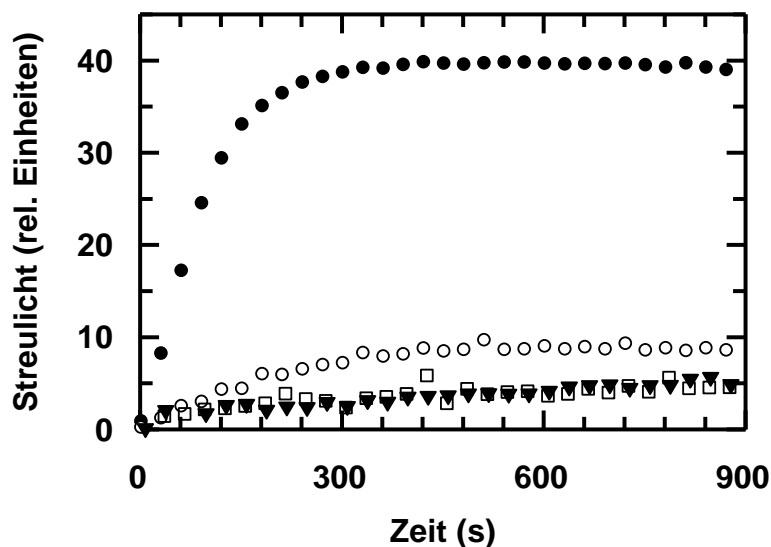


Abb. 3-27: Unterdrückung der Aggregation chaotrop denaturierter Citratsynthase durch Trigger-Faktor aus *T. maritima* und aus *E. coli*. Citratsynthase wurde bei Raumtemperatur in 6,0 M GdmCl, 20 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,7 eine Stunde lang entfaltet und anschließend 100-fach auf eine Endkonzentration von 0,15 μ M (Monomer) in 60 mM GdmCl, 0,2 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,7 bei 25°C verdünnt. Die Aggregation wurde über die Zunahme des Streulichts bei 360 nm in Abwesenheit (●) und in Gegenwart von 3,0 μ M *EcTF* (○) bzw. 0,15 μ M (▼) und 1,5 μ M (□) *TmTF* beobachtet. Die Streulichtintensität von Puffer und Trigger-Faktor wurde von den gemessenen Werten abgezogen.

Citratsynthase durchgeführt. Hier zeigt sich das enorme Potential von *TmTF* (Abb. 3-27). Während man einen 40-fachen Überschuss an *EcTF* benötigt, um die Aggregation von 0,15 μM Citratsynthase effizient zu verhindern (vgl. 3.1.3.), genügt schon der Einsatz einer stöchiometrischen Konzentration (0,15 μM) an *TmTF*, um denselben Effekt zu erhalten.

Dies lässt den Schluss zu, dass die Dissoziationskonstante des Komplexes aus *TmTF* und Citratsynthase im nanomolaren Bereich liegen sollte. Möglicherweise ist die effiziente Aggregationsunterdrückung aber auch auf eine geringere Dynamik der Substratbindung des *TmTF* bei niedrigen Temperaturen zurückzuführen. Im vorliegenden Citratsynthase Testsystem konkurrieren ja Chaperonassoziation und -dissoziation, erfolgreiche Rückfaltung und Aggregation kinetisch miteinander. Wenn durch eine relativ statische Substratbindung die Freisetzung der Citratsynthase verlangsamt wird, könnte das auch deren Aggregationsneigung verringern. Eine Untersuchung der Dynamik der Substratbindung wie mit dem Trigger-Faktor aus *E. coli* (vgl. 3.1.1.) konnte wegen des hohen Proteinbedarfs und der geringen zur Verfügung stehenden Menge an *TmTF* nicht durchgeführt werden.

Insgesamt zeigen die vorhandenen Resultate klar, dass beim Trigger-Faktor aus dem hyperthermophilen Organismus *T. maritima* die Chaperoneigenschaften im Vergleich zur Isomeraseaktivität deutlich in den Vordergrund treten.

Hinweise darauf, dass Prolylisomerasen wie Trigger-Faktor besonders bei niedrigen Temperaturen von Bedeutung sein dürften, lieferte später die Arbeit von Piette *et al.* mit dem psychrophilen (= kälteliebenden) antarktischen Bakterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*. Der Vergleich seines Proteoms bei 20°C und 4°C zeigte, dass die Expression des Trigger-Faktors beim Wechsel in die kalte Umgebung um den Faktor 37 hochreguliert wird. Die Autoren vermuteten daher, dass Trigger-Faktor das wichtigste Kälteanpassungsprotein (CAP) in diesem Organismus ist und dass die Proteinfaltung der geschwindigkeitsbegrenzende Faktor für das Bakterienwachstum bei extremer Kälte ist. Weiterhin gelang es den Autoren trotz mehrerer Ansätze nicht, eine Mutante von *Pseudoalteromonas haloplanktis* mit inaktiviertem Trigger-Faktorgen zu erzeugen. Auch wenn hierbei ein technischer Fehler nicht ausgeschlossen werden kann, ist dies doch ein Hinweis darauf, dass Trigger-Faktor – und diesmal insbesondere seine Prolylisomerasefunktion - anders als bei meso- und thermophilen Bakterien in diesem psychrophilen Organismus essentiell sein könnte (Piette *et al.* 2010).

3.2. Charakterisierung weiterer Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen

Trigger-Faktor war die erste gründlich charakterisierte Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase, die durch ihre Chaperoneigenschaft die Bindung an entfaltete Proteinketten so stark verbessert, dass dadurch auch die katalytische Effizienz der Prolylisomerisierung in Proteinsubstraten deutlich erhöht wird. Zwischenzeitlich wurden mehrere weitere Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen gefunden, die sich eine vergleichbare Strategie zunutze machen, um ihre Effizienz zu verbessern. Häufig handelt es sich dabei wie schon beim Trigger-Faktor um Isomerasen aus der FKBP-Familie, die durch zusätzliche Bindedomänen die Affinität zu Proteinsubstraten erhöhen. Einige dieser Isomerasen sollten im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden. Dabei handelt es sich um SlyD aus *Escherichia coli* (*EcSlyD*, alternativ *EcFKBP21*), FkpA aus *Escherichia coli* (*EcFkpA*, alternativ auch *EcFKBP29*), FKBP18 aus *Thermococcus sp. KS-1* (*TcFKBP18*) und FKBP22 aus *Neurospora crassa* (*NcFKBP22*) vom FKBP-Typ, sowie um SurA aus *Escherichia coli* (*EcSurA*) mit zwei Domänen vom Parvulin-Typ.

Während der Untersuchungen zu dieser Arbeit (1998-2002) standen Strukturdaten von den Proteinen der FKBP-Familie nur für FKBP12 aus Mensch (*hFKBP12*) (Van Duyne *et al.* 1991) und Rind (*btFKBP12*) (Moore *et al.* 1991; Wilson *et al.* 1995), sowie später von Mip aus *Legionella pneumophila* (*LpMip*) (Riboldi-Tunncliffe *et al.* 2001) zur Verfügung. Vermutungen zur Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Prolylisomerasen ließen sich also nur aus Sequenzvergleichen mit den wenigen Isomerasen bekannter Struktur treffen (s. Abb. 3-28 und 3-29 A links). *hFKBP12*, der „Prototyp“ für alle anderen FKBP-Proteine, besitzt eine Struktur aus fünf antiparallelen β -Faltblattsträngen, wobei der Faltblattstrang $\beta 5$ von einem so genannten *bulge* (Ausbeulung) unterbrochen wird. Die Sequenz zwischen den Faltblattsträngen $\beta 5$ und $\beta 2$ bildet eine α -Helix, die dem Faltblatt gegenüberliegt. Die Faltblattstränge $\beta 5$ und $\beta 6$ verbindet eine längere Schleife, der so genannte *flap* (Michnick *et al.* 1991; Moore *et al.* 1991; Van Duyne *et al.* 1991).

Das Interesse der Forschung konzentrierte sich lange Zeit besonders auf *hFKBP12*, da die Untersuchung dieses Proteins als Angriffspunkt mehrerer Immunsuppressiva besonders auch aus pharmazeutischer Sicht lukrativ erschien. Schließlich gehören Immunsuppressiva zu den wirtschaftlich bedeutendsten Medikamenten. So verordneten die deutschen Kassenärzte im Jahr 2008 allein das Präparat „Prograf“ (Wirkstoff *Tacrolimus* = FK506) im Gesamtwert von 100 Mio. Euro (Schwabe & Paffrath 2009).

Erst nach Beendigung der Experimente zu dieser Arbeit stand auch die erste Struktur eines SlyD-ähnlichen Proteins zur Verfügung: vom FKBP17 aus *Methanococcus thermolithotrophicus* (*MtFKBP17*; Abb. 3-29 rechts). Im Vergleich zu *hFKBP12* fehlt der Faltblattstrang $\beta 1$ und im Bereich des *flap* ist eine komplette Domäne aus 48 Aminosäuren eingeschoben. Diese so genannte IF-Domäne (*insert in the flap*) besitzt ein neuartiges mäanderförmiges Faltungsmotiv

(greek key fold) und exponiert eine hydrophobe Oberfläche, auf die man die auch in dieser Arbeit festgestellte Chaperonaktivität der SlyD-ähnlichen Proteine zurückführen könnte (Suzuki *et al.* 2003).

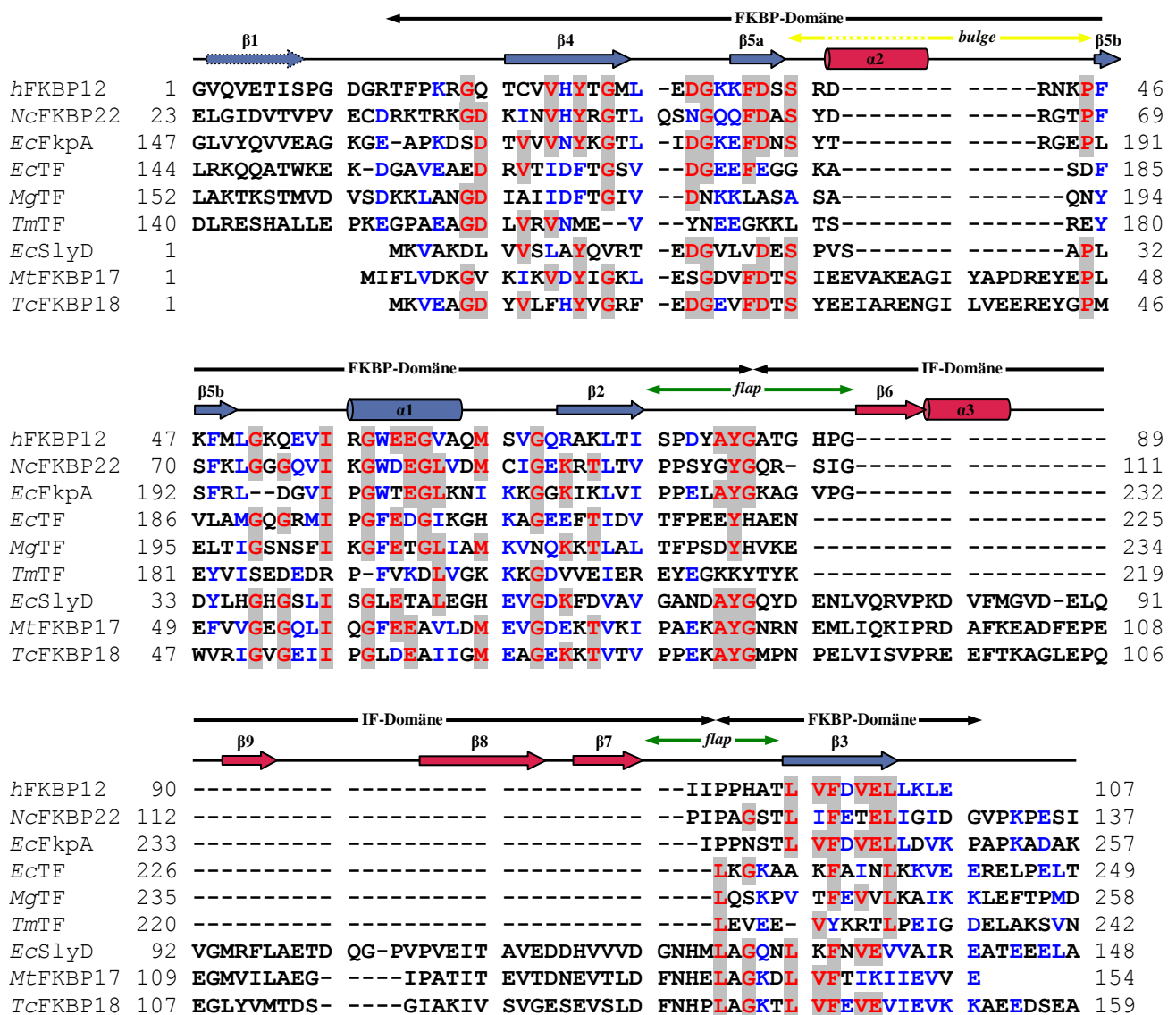


Abb. 3-28: Strukturbasiertes Sequenzalignment der FKBP-Domänen aller in dieser Arbeit verwendeten FKBP-Proteine mit hFKBP12 und MtFKBP17. Ausgehend von einem strukturbasierten Alignment von Suzuki *et al.* (2003) auf Grundlage der bis dahin bekannten FKBP-Strukturen von hFKBP12 (Van Duyne *et al.* 1991) und MtFKBP17 (Suzuki *et al.* 2003) wurde dieses Alignment mit Hilfe des Programmes ClustalW (Thompson *et al.* 1994) durchgeführt. Die Zahlen geben den Aminosäuresequenzausschnitt des jeweiligen Proteins an. Ähnliche Aminosäuren sind blau gedruckt, Aminosäuren, die an der betreffenden Position in mehr als 60 % der verglichenen Proteine vorkommen, sind rot mit grauem Hintergrund gedruckt. Die Nummerierung der Sekundärstrukturelemente bezieht sich auf die Darstellung von MtFKBP17 und hFKBP12 in Abb. 3-29, wobei Elemente, die nur in MtFKBP17 vorkommen rot, und solche, die auch in hFKBP12 vorkommen, blau gekennzeichnet sind.

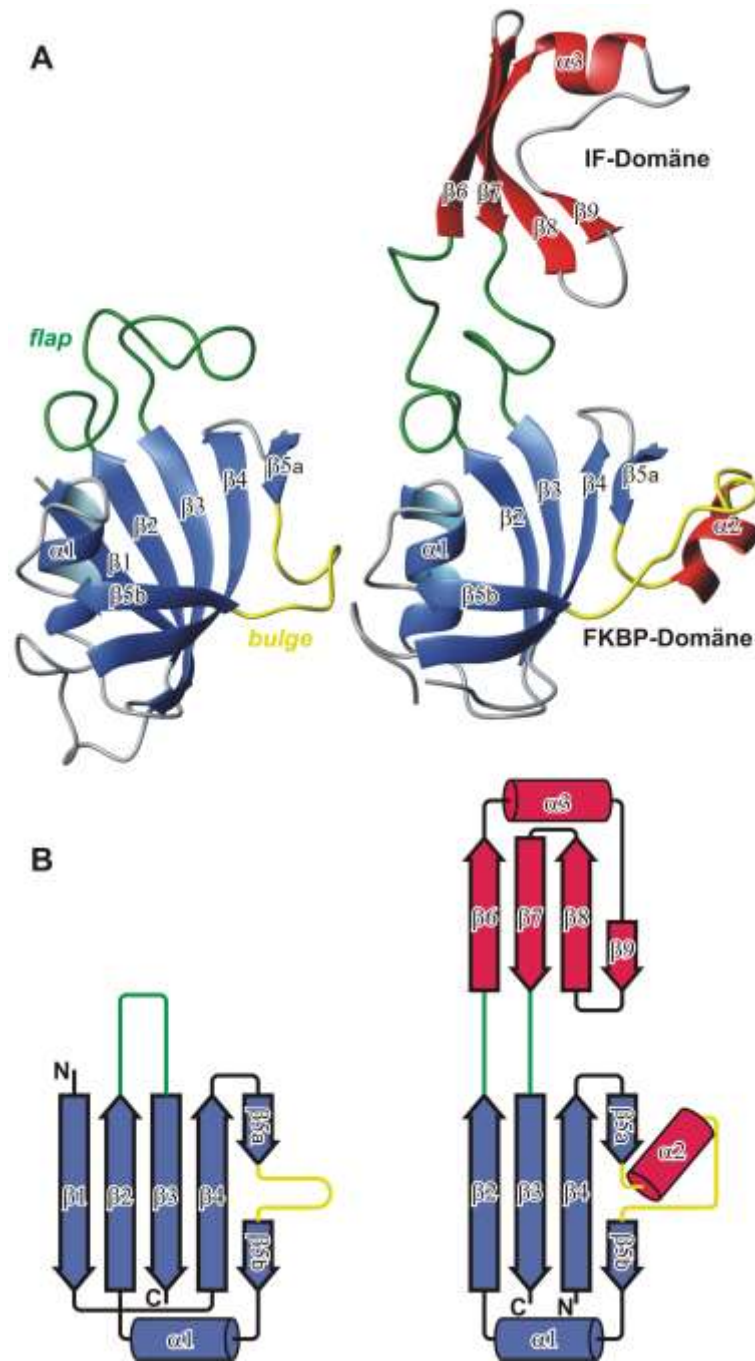


Abb. 3-29: Strukturvergleich von *hFKBP12* (links) und *MtFKBP17* (rechts). (A) Dreidimensionale Struktur der Proteine im Bänderdiagramm. Sekundärstrukturelemente, die nur in *MtFKBP17* vorkommen, sind rot gezeichnet, solche, die auch in *hFKBP12* vorkommen, blau. *Flap* und *bulge* sind grün bzw. gelb eingezeichnet. Die Strukturdarstellungen wurden mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.* 1996) unter Verwendung der PDB-Strukturdaten 1FKF (Van Duyne *et al.* 1991) und 1IX5 (Suzuki *et al.* 2003) erstellt. (B) Topologievergleich der beiden Proteine mit gleicher Farbgebung wie in (A).

Die Untersuchung der Proteine *EcSlyD*, *EcFkpA* und *TcFKBP18*, sowie diverser Variationen daraus resultiert aus einer Kooperation mit Christian Scholz von Roche Diagnostics, Penzberg. Ziel von Roche Diagnostics war es, für Zwecke der HIV-Diagnostik ein Ektodomänenfragment des HIV-1 Hüllproteins gp41 (Aminosäuren 532-681 = gp41^{*}; Sequenzen im Anhang) stabil in Lösung zu bringen. Bei HIV-1 infizierten Personen ist diese gp41 Ektodomäne das

Hauptziel der humoralen Immunantwort (Gnann *et al.* 1987; Norrby *et al.* 1987). Ihre Aminosäuresequenz ist in allen HIV-1 Untertypen hoch konserviert und Peptidausschnitte aus dem immunodominanten *loop* können sehr gut für diagnostische Zwecke eingesetzt werden (Wang *et al.* 1986). Allerdings neigt die gp41 Ektodomäne stark zur Aggregation, und insbesondere deren rekombinante Produktion in *E. coli* verlief lange Zeit nahezu erfolglos. Das sequenziell verwandte Hüllprotein gp21 des humanen T-lymphotropen Virus (HTLV) konnte als Fusionsprotein mit dem Maltosebindeprotein (MBP) aus *E. coli* stabil in Lösung gehalten werden (Kobe *et al.* 1999). Bei Versuchen der Expression der Ektodomäne von HIV-1 gp41 in Fusion mit dem Maltosebindeprotein (MBP) zeigte sich, dass zusammen mit dem nach wie vor aggregationsempfindlichen Fusionsprodukt MBP-gp41 die *E. coli* Proteine FkpA und SlyD mitgereinigt wurden (Scholz *et al.* 2005).

So entstand die Idee, die gp41-Ektodomäne als Fusionsprodukt mit einem oder mehreren Modulen dieser Proteine zu exprimieren. Tatsächlich zeigte sich, dass diese Fusionspartner die Aggregation der viralen Hüllproteine effizient unterdrücken konnten und dass die Überexpression dieser Fusionsproteine in *E. coli* mit Reinigung unter denaturierenden Bedingungen und anschließender Renaturierung zu nativähnlich gefalteten immunologisch reaktiven Formen dieser Virusproteine führte (Scholz *et al.* 2005). Es erschien erstaunlich, dass ausgerechnet Prolylisomerasen als Fusionspartner zum Erfolg führten. Deshalb sollten diese Isomerasen und die von ihnen abgeleiteten *single chain* Konstrukte im Rahmen dieser Arbeit bezüglich ihrer Isomerasen- und Chaperoneigenschaften untersucht werden.

3.2.1. SlyD

Das *slyD*-Gen wurde ursprünglich identifiziert bei der Suche nach Mutanten von *E. coli* C, die nach Induktion des klonierten Lysegens *E* des Bakteriophagen Φ X174 überleben können. Mutationen in diesem *slyD*-Gen führten zu einer Anhäufung kompletter Phagen innerhalb der Zellen, ohne dass dies zu deren Lyse führte (Maratea *et al.* 1985). Die Bezeichnung SlyD leitet sich von diesem Phänotyp her: Nur der *slyD* Wildtyp des Wirtstamms *E. coli* C ist *sensitive to lysis*. Sequenzvergleiche führten später zu der Annahme, dass es sich bei SlyD um ein Protein aus der FKBP-Familie handeln sollte. Unabhängig davon wurde SlyD auch noch entdeckt als „WHP“ (*wonderous histidine-rich protein*), das an die Nickelionen in Ni-NTA-Agarose bindet und daher als Verunreinigung in Proteinpräparationen nach Nickel-Affinitätschromatographie auftauchen kann (Wülfing *et al.* 1994).

1997 konnte für SlyD als siebtes Protein aus *E. coli* eine Prolylisomeraseaktivität nachgewiesen werden. Allerdings lag die gemessene Aktivität bei nahezu null im klassischen chymotrypsingekoppelten Peptidtest, da SlyD selbst sehr chymotrypsinempfindlich ist. Jedoch konnte in einem trypsingekoppelten Test eine relativ schwache Isomeraseaktivität mit einer Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M von $3,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für SlyD detektiert werden. Neuartig war in

diesem Fall die Feststellung, dass die Prolylisomeraseaktivität von SlyD durch die Bindung von Nickelionen zu 90 % inhibiert werden konnte (Hottenrott *et al.* 1997).

Der Sequenzvergleich von SlyD mit hFKBP12 (Abb. 3-28) ergab die Annahme, dass SlyD aus zwei Domänen bestehen sollte: Zum einen aus einer C-terminalen FKBP-homologen Domäne, wobei im Vergleich zu hFKBP12 der erste Faltblattstrang $\beta 1$ fehlt, dafür aber mit einer noch unbekannten längeren Insertion im *flap*. Zum anderen aus einer C-terminalen histidin- und cysteinreichen Domäne, die für die Ionenbindung verantwortlich ist.

Aufgrund der gemessenen schwachen Isomeraseaktivität wurde SlyD anfangs eher geringes Interesse entgegengebracht. Dass SlyD jedoch im Proteinrückfaltungstest mit RCM-T1 sehr aktiv ist, zeigte sich erst im Nachhinein durch einen Zufall: Christian Scholz wollte das mitochondriale Cyclophilin Cpr3 und zwei mutierte Varianten untersuchen. Die Expression aller Varianten erfolgte als His₆-Fusionsprotein in *E. coli* und die Reinigung durch eine Affinitätschromatographie an Ni-NTA. Während die mutierten Varianten im proteasegekoppelten Peptidtest fast völlig inaktiv waren, wurde im Faltungstest nahezu dieselbe hohe Aktivität wie beim Wildtyp-Cpr3 detektiert. Dieser Befund wurde 1997 publiziert (Scholz *et al.* 1997a). Nach weiteren Experimenten zeigte sich jedoch, dass die gemessene Aktivität im Faltungstest hauptsächlich von einer minimalen Verunreinigung mit SlyD stammte. Während dieses aufgrund seiner Chymotrypsinempfindlichkeit im „klassischen“ Peptidtest nahezu nicht detektierbar war, zeigte es im Proteinfaltungstest eine vielfach höhere Aktivität als Cpr3 und verfälschte daher – obwohl nur in geringen Spuren vorhanden – völlig das vermeintlich für Cpr3 und seine Varianten erhaltene Messergebnis (Scholz *et al.* 1999).

Wiederum Christian Scholz stellte später wie oben erwähnt fest, dass SlyD als Fusionsprodukt an der Ektodomäne des HIV1-Hüllproteins gp41 dessen Überexpression und Stabilisierung in Lösung ermöglicht. Bereits Hottenrott *et al.* (1997) hatten festgestellt, dass die Gegenwart des C-terminalen histidin- und cysteinreichen Abschnittes von SlyD wenig Auswirkung auf die Aktivität des Enzyms hat. Allerdings verliert die um diesen Abschnitt verkürzte Variante SlyD (1-165) (= SlyD^{*}; Sequenzen im Anhang) ihre Inhibierbarkeit durch Nickelionen. Da auch SlyD^{*} als Fusionsprodukt die gp41-Ektodomäne in Lösung zu halten vermochte, verwendete Roche Diagnostics nahezu nur noch diese verkürzte Variante, da durch das Fehlen des cysteinreichen Endes unerwünschte Reaktionen wie intra- und intermolekulare Disulfidverbrückungen vermieden werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun die Isomerase- und Chaperoneigenschaften von SlyD^{*} näher untersucht werden.

3.2.1.1. SlyD^{*} als Faltungshelfer

Wie schon im Falle des Trigger-Faktors erfolgte die Bestimmung der Isomeraseaktivität von SlyD^{*} im RCM-T1 Proteinrückfaltungstest. Abbildung 3-30 A zeigt die Beschleunigung

der Rückfaltung von 100 nM RCM-T1 durch verschiedene Konzentrationen an SlyD^{*}. Bereits in Gegenwart von 5 nM SlyD^{*} ist diese Reaktion im Vergleich zur unkatalysierten Rückfaltung mehr als vierfach beschleunigt.

Die apparenten Raten der Rückfaltung steigen linear mit der eingesetzten SlyD^{*}-Konzentration (Abb. 3-30 B, ●). Aus der Steigung dieser Auftragung ergibt sich eine Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M von $1,19 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für SlyD^{*}. Ähnlich wie der Trigger-Faktor zeigt SlyD^{*} sein enormes katalytisches Potential also auch erst im Proteinrückfaltungstest. Während die meisten bis dahin charakterisierten Prolylisomerasen die Isomerisierung in einem kurzen Testpeptid wesentlich effizienter katalysieren als in einem faltenden Proteinsubstrat, liegt die katalytische Effizienz von SlyD^{*} im Proteinrückfaltungstest um nahezu zwei Größenordnungen höher als im trypsingekoppelten Peptidtest ($k_{\text{cat}}/K_M = 3,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch im Falle von SlyD^{*} eine starke Bindung des entfalteten Proteinsubstrates die Ursache für die hohe Aktivität im Rückfaltungstest sein dürfte.

Da Roche Diagnostics SlyD^{*} als Fusionspartner für die dauerhafte Stabilisierung eines aggregationsempfindlichen Proteins einsetzen wollte, war es notwendig, die zeitliche und thermodynamische Stabilität dieser Prolylisomerase zu untersuchen. Dabei zeigte sich bei der Messung der optischen Aktivität, dass SlyD^{*} nach thermischer Denaturierung sehr schnell und vollständig in seine native Struktur zurückfaltet (C. Scholz, persönliche Mitteilung).

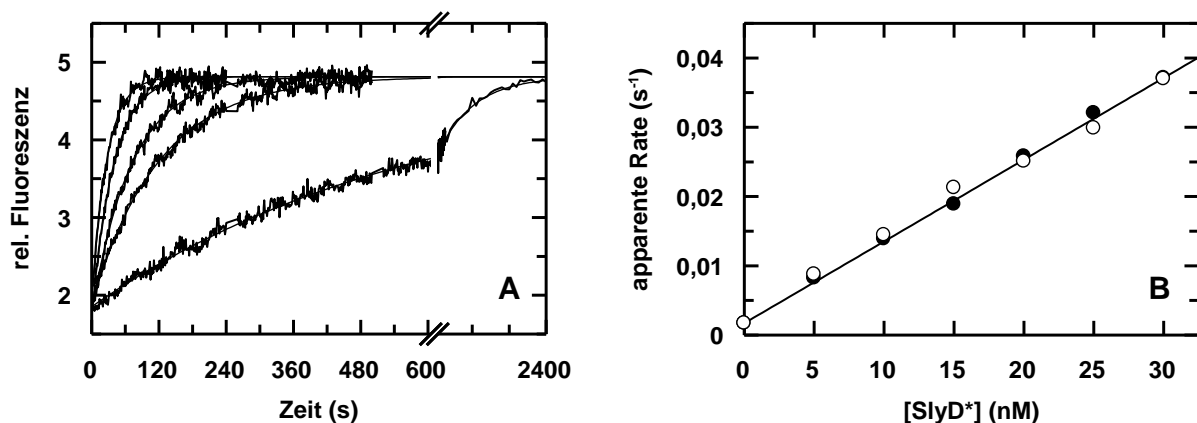


Abb. 3-30: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch SlyD^{*} bzw. renaturiertes SlyD^{*}.

(A) Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von 0,1 μM RCM-T1 in Abwesenheit (unterste Kurve) und Gegenwart von 5, 10, 20 und 30 nM SlyD^{*} (von unten nach oben). Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. RCM-T1 wurde bei 15°C in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 0,1 μM RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven). (B) Abhängigkeit der apparenten Raten der Rückfaltung von RCM-T1 von der Konzentration an SlyD^{*} (●) bzw. an renaturiertem SlyD^{*} (○). Für renaturiertes SlyD^{*} wurde 1 μM SlyD^{*} zunächst zur Entfaltung 30 min bei 75°C und anschließend zur Rückfaltung 30 min bei 15°C inkubiert und schließlich wie in Teilabbildung A im Rückfaltungstest eingesetzt (Zeitverläufe nicht gezeigt). Die Enzymaktivität vor und nach dem Hitzeschritt war nahezu identisch: Aus der Steigung der Regressionsgeraden an die apparenten Raten der Rückfaltungsverläufe resultieren Spezifitätskonstanten (k_{cat}/K_M) von $1,19 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für SlyD^{*} und $1,18 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für renaturiertes SlyD^{*}.

Neben diesen Hinweisen auf eine korrekte Rückfaltung von SlyD^{*} durch Circular dichroismus war es natürlich interessant zu erfahren, ob das Protein nach einer thermischen Denaturierung auch seine enzymatische Aktivität zurückerlangt. Zu diesem Zweck wurde parallel zur Aktivitätsmessung von nicht denaturiertem Enzym (Abb. 3-30 A) 1 μM SlyD^{*} der gleichen Charge zunächst 30 min bei 75°C entfaltet und anschließend zur Rückfaltung 30 min bei 15°C inkubiert. Danach wurde das so vorbehandelte Enzym ebenfalls im RCM-T1-Rückfaltungstest eingesetzt. Es unterschied sich in seiner Katalysewirkung nicht vom Ausgangsprodukt. Die Auftragung der apparenten Raten der RCM-T1-Rückfaltung gegen die eingesetzte Konzentration an renaturiertem SlyD^{*} (Abb. 3-30 B, ○) ergab eine katalytische Effizienz $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $1,18 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und somit praktisch einen identischen Wert wie für das nicht thermisch behandelte Enzym. SlyD^{*} kann also Hitzephasen sehr gut überstehen und faltet danach nahezu verlustfrei in seine aktive dreidimensionale Struktur zurück.

3.2.1.2. scSlyD^{*}₂ als Faltungshelfer

In früheren Veröffentlichungen wurde SlyD als homodimeres Protein beschrieben (Mitterauer *et al.* 1999; Mukherjee *et al.* 2003). Auch die verkürzte Form SlyD^{*} eluierte bei Gelfiltrationsexperimenten apparent als Dimer (Scholz *et al.* 2006). Allerdings deuteten später Gleichgewichtsuprazentrifugationsexperimente darauf hin, dass SlyD^{*} in Lösung als Monomer vorliegen sollte (Hauke Lilie, Halle, unveröffentlichte Ergebnisse).

Möglicherweise sollte die (heute angezweifelte) Dimerisierung von SlyD seine Fähigkeit, gp41^{*} zu stabilisieren, beeinflussen. Unter der Annahme, dass ein 23 Aminosäuren langer Linker zwischen den einzelnen SlyD^{*}-Modulen ausreichend Flexibilität für eine korrekte intramolekulare Dimerisierung der beiden SlyD^{*}-Einheiten gewährleisten dürfte, wurde von Roche Diagnostics ein SlyD^{*}-SlyD^{*}-gp41^{*}-Fusionsprotein hergestellt. Tatsächlich konnte so die Stabilität des Fusionsprodukts weiter erhöht werden: Während das einfache Konstrukt SlyD^{*}-gp41^{*} bereits bei Temperaturen ab 30°C zur Aggregation tendierte, blieb das größere Konstrukt SlyD^{*}-SlyD^{*}-gp41^{*} auch bei 35°C über viele Stunden stabil in Lösung (Scholz *et al.* 2005).

Somit stellte sich natürlich die Frage, ob die durch die Fixierung auf eine Polypeptidkette erleichterte Dimerisierung der SlyD^{*}-Module auch deren enzymatische Eigenschaften beeinflusst. Vielleicht könnte ja durch eine stärkere Substratbindung ans Dimer auch die katalytische Effizienz von SlyD^{*} gesteigert werden. Hierzu wurde das *single chain* Konstrukt scSlyD^{*}₂ hergestellt (Aminosäuresequenz im Anhang). Dieses Protein wurde ebenfalls im RCM-T1-Rückfaltungstest eingesetzt (Abb. 3-31 A). Es zeigte eine noch höhere Aktivität als das zuvor verwendete SlyD^{*}. Die Auftragung der gemessenen apparenten Raten gegen die eingesetzte Konzentration an scSlyD^{*}₂ (Abb. 3-31 B, ●) ergab eine katalytische Effizienz von $1,77 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für scSlyD^{*}₂.

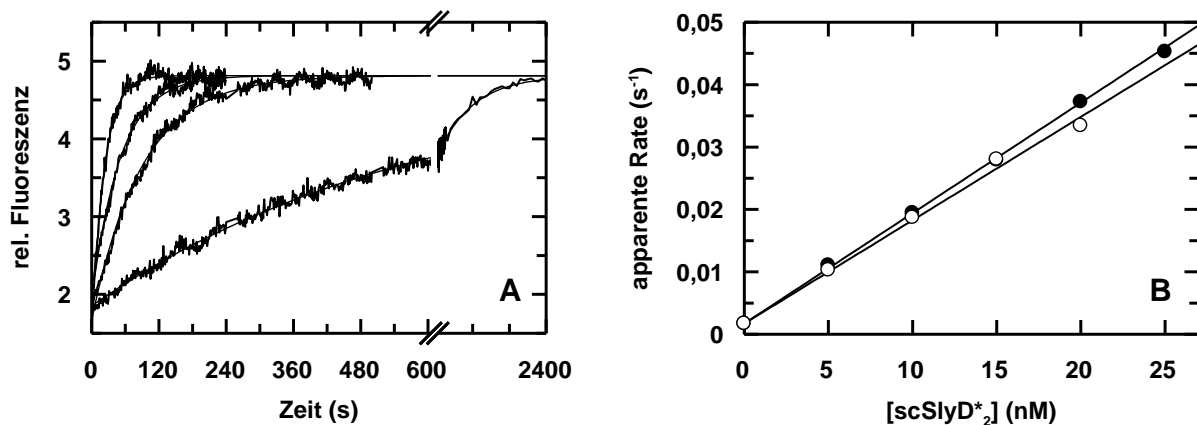


Abb. 3-31: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch scSlyD₂* bzw. renaturiertes scSlyD₂*. (A) Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von 0,1 μ M RCM-T1 in Abwesenheit (unterste Kurve) und Gegenwart von 5, 10 und 25 nM SlyD* (von unten nach oben). Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. RCM-T1 wurde bei 15°C in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 0,1 μ M RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven). (B) Abhängigkeit der apparenten Raten der Rückfaltung von RCM-T1 von der Konzentration an scSlyD₂* (●) bzw. an renaturiertem scSlyD₂* (○). Für renaturiertes scSlyD₂* wurde 1 μ M SlyD₂* zunächst zur Entfaltung 30 min bei 75°C und anschließend zur Rückfaltung 30 min bei 15°C inkubiert und schließlich wie in Teilabbildung A im Rückfaltungstest eingesetzt (Zeitverläufe nicht gezeigt). Die Enzymaktivität vor und nach dem Hitzeschritt unterschied sich nur schwach: Aus den Steigungen der Regressionsgeraden resultieren Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M von $1,77 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für scSlyD₂* und $1,66 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für renaturiertes scSlyD₂*.

Ebenso wurde die Reversibilität der thermischen Denaturierung von scSlyD₂* durch einen Hitzepuls von 30 min bei 75°C und anschließende Renaturierung von 30 min bei 15°C im Aktivitätstest überprüft. Auch hier zeigte sich, dass scSlyD₂* zu einem hohen Anteil korrekt in seine aktive Struktur zurückfaltet. Die erhaltene katalytische Effizienz (Abb. 3-31 B, ○) liegt mit $1,66 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für das renaturierte Enzym nur um 6% niedriger als die des thermisch unbehandelten scSlyD₂*.

Die Erwartung, dass die erleichterte Dimerisierung in scSlyD₂* die Effizienz von SlyD* als Prolylisomerase deutlich verbessern könnte, hat sich nicht erfüllt. Zwar liegt die gemessene Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M von scSlyD₂* um etwa 50 % höher als die von SlyD*, allerdings muss man bedenken, dass pro scSlyD₂*-Molekül zwei SlyD*-Module vorliegen. Die einzelnen Module im scSlyD₂*-Konstrukt sind daher also sogar etwas weniger aktiv als im freien SlyD*. Betrachtet man die Prolylisomeraseaktivität, so kann man also bestenfalls von einem „additiven“ Effekt durch die Fusion zweier SlyD*-Module auf einer Proteinkette sprechen.

3.2.1.3. scSlyD^{*}₂ als Chaperon

Christian Scholz konnte im Rahmen seiner Doktorarbeit zeigen, dass SlyD sich im RCM-T1-Rückfaltungstest wie ein Michaelis-Menten-Enzym verhält und die Michaeliskonstante K_M für die Kombination aus SlyD und RCM-T1 mit 1,5 μM bestimmen (Scholz 1999).

Die ähnliche enzymatische Charakteristik von SlyD^{*} und Trigger-Faktor, insbesondere die hohe Affinität gegenüber entfalteten Proteinsubstraten im Vergleich zu synthetischen Oligopeptiden legte die Vermutung nahe, dass SlyD ähnlich wie Trigger-Faktor sowohl als Isomerase als auch als Chaperon wirken könnte. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Chaperonaktivität von scSlyD^{*}₂ im Aggregationstest mit Citratsynthase (Buchner *et al.* 1998) untersucht.

Anders als im Fall von Trigger-Faktor, wo erst ein 20-facher Überschuss des Chaperons zur deutlichen Unterdrückung der Aggregation von 0,15 μM chemisch denaturierter Citratsynthase nötig war (s. Abschnitt 3.1.3.), kann dies bereits durch einen zweifachen Überschuss an scSlyD^{*}₂ erreicht werden (Abb. 3-32). Bei weiterer Erhöhung des Überschusses an scSlyD^{*}₂ wird die Aggregation der Citratsynthase vollständig unterdrückt. Bei scSlyD^{*}₂ handelt es sich also um ein hocheffizientes Chaperon. Dies erklärt vermutlich, warum in dem Konstrukt SlyD^{*}-SlyD^{*}-gp41^{*} die Aggregation der gp41^{*}-Ektodomäne so erfolgreich verhindert wird.

Eine große Rolle für die Chaperonaktivität von scSlyD^{*}₂ spielt in diesem Fall tatsächlich die Eigenschaft, dass sich zwei SlyD^{*}-Module auf einer Kette befinden. Um bei Citratsynthase

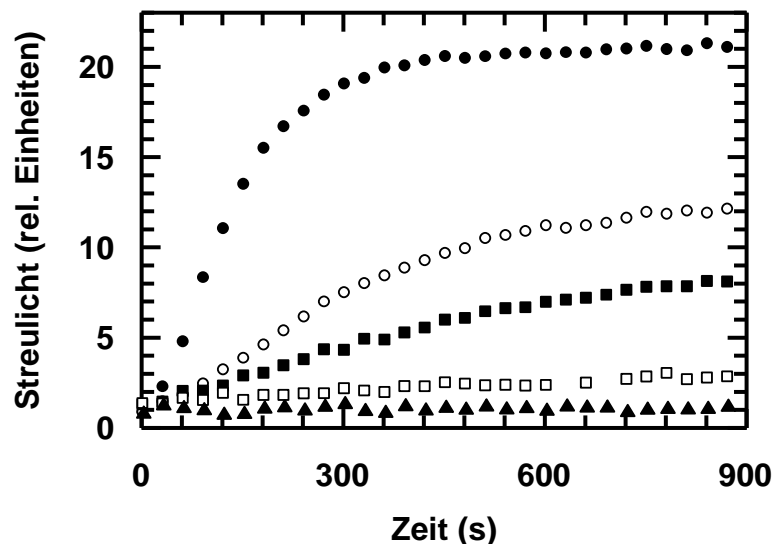


Abb. 3-32: Unterdrückung der Aggregation chaotrop denaturierter Citratsynthase durch scSlyD^{*}₂. Citratsynthase wurde bei Raumtemperatur in 6,0 M GdmCl, 20 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,7 eine Stunde lang entfaltet und anschließend 100-fach auf eine Endkonzentration von 0,15 μM (Monomer) in 60 mM GdmCl, 0,2 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,7 bei 25°C verdünnt. Die Aggregation wurde über die Zunahme des Streulichts bei 360 nm in Abwesenheit (●) und in Gegenwart von 0,075 (○), 0,15 (■), 0,3 (□) und 1,5 (▲) μM scSlyD^{*}₂ beobachtet. Die Streulichtintensität von Puffer und scSlyD^{*}₂ wurde von den gemessenen Werten abgezogen.

eine ähnlich starke Aggregationsunterdrückung wie mit nur 0,15 μM scSlyD^{*}₂ zu erreichen, benötigt man 3 μM an freiem SlyD^{*} (Knappe *et al.* 2007). Anders als bei der Isomeraseaktivität ergibt die Aneinanderreihung zweier Proteinmodule im Falle der Chaperonaktivität eine deutliche Verstärkung. Die Gründe hierfür sind nach wie vor nicht völlig klar. Möglicherweise bewirkt die räumliche Nähe mehrerer Chaperonmodule auf einer Proteinkette eine bessere Abschirmung der entfalteten Proteinkette nach außen und somit eine deutlich verbesserte Aggregationsunterdrückung, während dies für die Faltungsaktivität keinen Vorteil bringt.

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Messungen lagen noch keine Strukturinformationen zum räumlichen Aufbau von SlyD vor. Die später erfolgte Strukturaufklärung des SlyD-homologen *MtFKBP17* durch Suzuki *et al.* (2003) (Abb. 3-29 rechts) ergab, dass diesem Protein im Vergleich zu *hFKBP12* der Faltblattstrang $\beta 1$ fehlt und dass im Bereich des *flap* eine komplette Domäne aus 48 Aminosäuren insertiert ist. Diese so genannte IF-Domäne besitzt ein neuartiges mäanderförmiges Faltungsmotiv (*greek key fold*) und exponiert eine hydrophobe Oberfläche, auf die man die in dieser Arbeit festgestellte Chaperonaktivität der SlyD-ähnlichen Proteine zurückführen könnte.

Sequenzvergleiche wie in Abbildung 3-28 legten den Schluss nahe, dass *EcSlyD* und SlyD aus zahlreichen anderen Spezies eine ähnliche Struktur annehmen sollten wie *MtFKBP17* – insbesondere was die eingeschobene IF-Domäne angeht. Scholz *et al.* konnten später zeigen, dass SlyD^{*}-Fragmente auch aus *Yersinia pestis*, *Treponema pallidum*, *Pasteurella multocida* und *Vibrio cholerae* ähnliche Aktivitäten im RCM-T1-Rückfaltungstest zeigen wie *EcSlyD* und effizient durch dauerhaft entfaltete Proteinsubstrate wie RCM-La oder RCM-P39A-T1 inhibiert werden können (Scholz *et al.* 2006).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Proteinfaltungsaktivität des humanen FKBP12 durch Insertion der IF-Domäne aus *EcSlyD* 200-fach erhöht wird. Das resultierende Konstrukt war ein effizienterer Faltungskatalysator als *EcSlyD* selbst. Die Tatsache, dass diese Insertion jedoch keinen Einfluss auf die Prolylisomeraseeffizienz gegenüber kurzen Tetrapeptiden hatte, unterstützt die Annahme, dass die IF-Domäne in SlyD der FKBP-Einheit eine Chaperondomäne beisteuert, welche entfaltete Proteinketten ans Enzym bindet und daher die Substrataffinität und somit auch die katalytische Effizienz bei der Faltungskatalyse signifikant erhöht (Knappe *et al.* 2007).

Später bestätigten NMR-Strukturaufklärungen die strukturelle Ähnlichkeit von *EcSlyD* und *MtFKBP17*. Aus der Struktur des SlyD-Volllängenproteins in Zusammenhang mit Metallbindungsstudien konnte die starke Nickelionenabhängigkeit der Enzymaktivität erklärt werden (Martino *et al.* 2009). Für SlyD^{*} konnte gezeigt werden, dass die Orientierung der IF-Domäne zur FKBP-Domäne nicht rigide fixiert ist, sondern dass beide Domänen sehr flexibel miteinander verbunden sind. Durch NMR-Titrationsexperimente konnte weiterhin gezeigt werden, dass entfaltete oder teilgefaltete Proteinketten von der IF-Domäne erkannt und gebunden werden.

Vermutlich „fängt“ die IF-Domäne also potentielle SlyD-Substrate ein, erhöht so die effektive Substratkonzentration in der Umgebung der FKBP-Domäne und macht dadurch SlyD zu einem derart effizienten Katalysator der Proteinfaltung (Weininger *et al.* 2009).

3.2.2. FkpA

EcFkpA ist ebenfalls eine Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase vom FKBP-Typ. Sie nimmt auf der periplasmatischen Seite der Periplasmamembran gewissermaßen die Rolle des „Pfortners“ am Translocon ein, wobei ihre Expression durch Hitzeschock erhöht wird (Danese *et al.* 1995; Arie *et al.* 2001). Hierbei kommt FkpA allerdings keine essentielle Funktion zu, da eine Eliminierung des FkpA-Gens zu keinem signifikanten Phänotyp führt (Horne & Young 1995; Kleerebezem *et al.* 1995).

Anlass für die Beschäftigung mit FkpA in dieser Arbeit war die Identifikation von FkpA in Präparationen des aggregationsempfindlichen Fusionsprodukts MBP-gp41^{*} und die daraus resultierende Hoffnung, dieses Konstrukt als Fusionsprotein mit FkpA dauerhaft löslich exprimieren zu können (s.o.). Unabhängig davon konnte eine Gruppe der Universität Zürich zeigen, dass eine Coexpression von FkpA auch die rekombinante periplasmatische Expression einiger *single chain*-Antikörperfragmente (scFv) in *E. coli* deutlich verbessern konnte (Bothmann & Plückthun 2000).

EcFkpA wird als Vorläuferprotein von 270 Aminosäuren am Ribosom synthetisiert. Beim Übertritt ins Periplasma wird eine N-terminale 25 Aminosäuren lange Signalsequenz abgespalten, so dass die reife Form des Enzyms aus den Aminosäuren 26-270 besteht. Bei allen Konstrukten dieser Arbeit bezeichnet „FkpA“ diese 245 Reste lange reife Form. Die Signalsequenz des natürlichen Vorläuferproteins wurde jeweils nicht mit exprimiert, um das überexprimierte FkpA beziehungsweise die davon abgeleiteten Konstrukte im Cytosol zu halten und nicht ins Periplasma exportieren zu lassen. Weiterhin trugen viele FkpA-Varianten klonierungsbedingt C-terminal noch eine Pro-Trp-Leu-Glu-Sequenz (PWLE) oder Leu-Glu-Sequenz (LE) und abschließend einen Hexa-Histidin-*tag* (Sequenzen im Anhang).

3.2.2.1. FkpA als Faltungshelfer

Bei ersten Experimenten von Roche Diagnostics mit FkpA zeigte sich, dass die Aktivität der Isomerase mit zunehmender Aufbewahrungsdauer und steigender Zahl an Auftau- und Einfrierzyklen deutlich abnahm. Daher sollten die ersten Aktivitätsmessungen im Rahmen dieser Arbeit zur Optimierung der Lagerbedingungen von FkpA durchgeführt werden.

Zu diesem Zweck wurde die vorliegende Enzymprobe auf vier Puffersysteme aufgeteilt, von denen bekannt war, dass sie die Haltbarkeit anderer Enzyme verbessern konnten. Zusätz-

lich zum gemeinsamen Puffersystem 100 mM NaCl, 20 mM Natriumphosphat pH 7,4 enthielten diese Puffer entweder keine oder die folgenden Additive: 5 % (w/v) Saccharose, 10 % (w/v) Glycerin oder 10 mM Arginin. Die Proteinlösungen wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren, nach 7 Tagen Lagerung bei -20°C langsam auf Eis aufgetaut und weitere 24 Stunden im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurde die verbliebene Prolylisomeraseaktivität im RCM-T1-Rückfaltungstest bestimmt. Die erhaltenen Spezifitätskonstanten sind in Tabelle 3-2 aufgelistet. Am besten hatte sich die Aktivität in der Lösung mit 5 % Saccharose erhalten. Diese lag um 20 % höher als in den Lösungen ohne Additive oder mit 10 % Glycerin. Daher wurden künftige FkpA-Präparationen sofort nach Abschluss der Reinigung im Lagerungspuffer 5 % (w/v) Saccharose, 100 mM NaCl, 20 mM Natriumphosphat pH 7,4 aufbewahrt.

Tabelle 3-2: Prolylisomeraseaktivität von *Ec*FkpA im RCM-T1-Rückfaltungstest

Lagerbedingungen	Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)
FkpA ohne Additive	235.000
FkpA in 5 % (w/v) Saccharose	282.000
FkpA in 10 % (w/v) Glycerin	235.000
FkpA in 10 mM Arginin	270.000

Gemessen wurde die Enzymaktivität bei der Rückfaltung von 200 nM RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C (vgl. Abb. 3-33).

Die Prolylisomeraseaktivität einer frischen FkpA-Präparation im oben beschriebenen Lagerungspuffer wurde anschließend im RCM-T1-Rückfaltungstest bei einer Substratkonzentration von 0,1 μM RCM-T1 bestimmt (s. Abb. 3-33). Die katalytische Effizienz von FkpA liegt mit $9,8 \cdot 10^5 M^{-1} s^{-1}$ im Proteinrückfaltungstest in der Größenordnung des Trigger-Faktors aus *E. coli* und um eine Zehnerpotenz höher als der Wert aus dem proteasegekoppelten Peptidtest mit Tetrapeptiden ($9,8 \cdot 10^4 M^{-1} s^{-1}$) (Missiakas *et al.* 1996). Es lag daher die Vermutung nahe, dass auch bei FkpA die höhere Aktivität im Proteinfaltungstest aus einer starken Affinität für entfaltete Proteine resultieren könnte. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich die Faltungsaktivität von FkpA ähnlich derer von Trigger-Faktor durch die Gegenwart dauerhaft entfalteter Proteinmoleküle inhibieren lässt. Wie schon erwähnt, liegt die reduzierte und carboxymethylierte Form von α -Lactalbumin (RCM-La) in wässriger Lösung permanent entfaltet vor und wird daher häufig zur Untersuchung von Chaperonen verwendet.

Tatsächlich inhibiert RCM-La die katalytische Funktion von FkpA im RCM-T1-Rückfaltungstest (s. Abb. 3-34). Bei hohen Konzentrationen des Inhibitors RCM-La nähert sich die Rückfaltungsgeschwindigkeit der Geschwindigkeit der unkatalysierten Rückfaltung. Die Inhibitionskonstante K_i liegt bei 1,5 μM und somit in einer ähnlichen Größenordnung wie für den

Trigger-Faktor aus *E. coli*. Offenbar wird die hohe Faltungsaktivität von FkpA also tatsächlich ebenfalls durch eine starke Bindung entfalteter Proteinsubstrate erreicht.

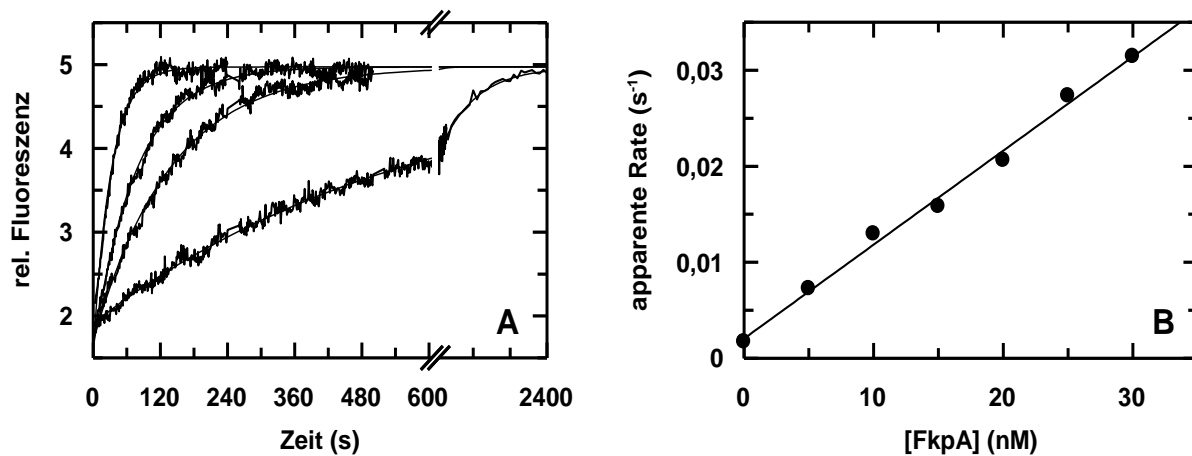


Abb. 3-33: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch FkpA. (A) Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von 0,1 µM RCM-T1 in Abwesenheit (unterste Kurve) und Gegenwart von 5, 10 und 30 nM FkpA (von unten nach oben). Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. RCM-T1 wurde bei 15°C in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 0,1 µM RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven). (B) Abhängigkeit der apparenten Raten der Rückfaltung von RCM-T1 von der FkpA-Konzentration. Aus der Steigung der Regressionsgeraden resultiert eine Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $9,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die katalytische Effizienz von FkpA.

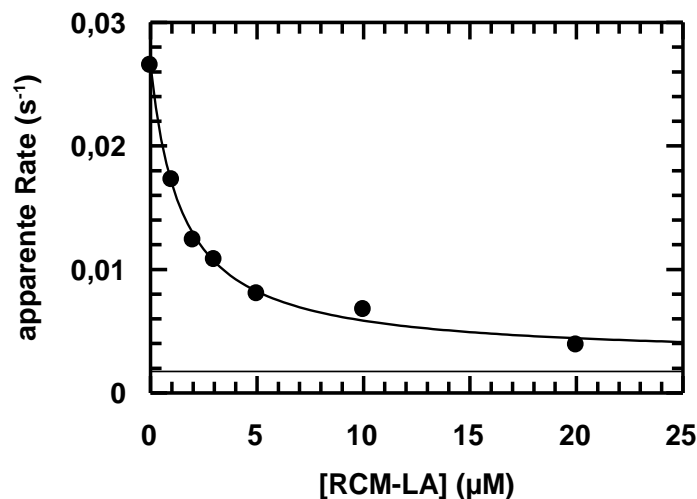


Abb. 3-34: Inhibition der FkpA-katalysierten Rückfaltung von RCM-T1 durch RCM-La. Gemessen wurde der zeitliche Verlauf der Rückfaltung von 0,2 µM RCM-T1 in Gegenwart von 50 nM FkpA und 0-20 µM RCM-La. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 0,2 µM RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe (Daten nicht gezeigt) wurden monoexponentielle Kurven angeglichen und die daraus erhaltenen apparenten Raten der FkpA-katalysierten Rückfaltung in Abhängigkeit der RCM-La-Konzentration aufgetragen. Bei hohen Konzentrationen des Inhibitors RCM-La nähert sich die Rückfaltungsgeschwindigkeit der Geschwindigkeit der unkatalysierten Rückfaltung ($0,00175 \text{ s}^{-1}$; waagrechte Linie). Halbmaximale Inhibition wurde rechnerisch durch 1,5 µM RCM-La erreicht.

3.2.2.2. Isomeraseaktivität des Fusionskonstrukts MBP-gp41^{*}-FkpA

Wie bereits mehrfach erwähnt, war die Basis für das Interesse von Roche Diagnostics an einer Zusammenarbeit im Bereich der Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen die Tatsache, dass die Ektodomäne des HIV-1 Hüllproteins gp41 in Fusion mit dem Maltosebindeprotein (MBP) und FkpA stabil in Lösung gehalten werden konnte (Scholz *et al.* 2005).

Nun sollte untersucht werden, ob die FkpA-Einheit in diesem Konstrukt MBP-gp41^{*}-FkpA (Aminosäuresequenz im Anhang) noch ähnlich als Prolylisomerase aktiv ist wie im freien Enzym oder ob die sequenzielle Anbindung an andere Proteinfragmente diese Aktivität unterbindet. Die Messung des Fusionskonstrukts im RCM-T1-Rückfaltungstest ergab, dass die Faltungsaktivität der FkpA-Einheit im Vergleich zum freien Protein um nahezu zwei Zehnerpotenzen vermindert wurde (s. Abb. 3-35). Die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M für die katalytische Effizienz lag bei lediglich $1,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

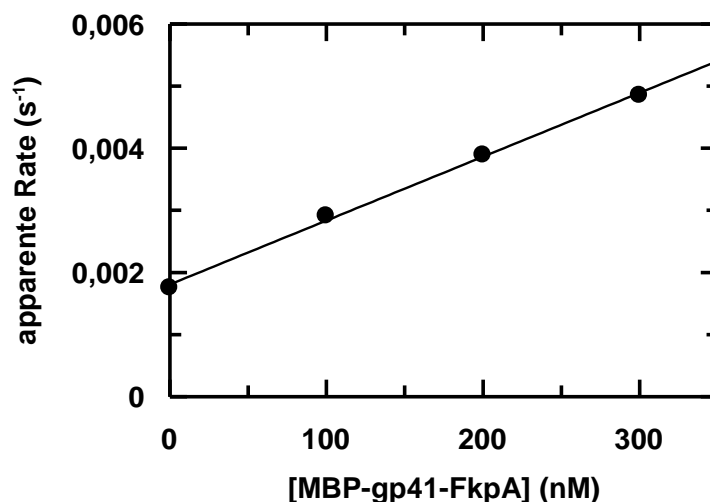


Abb. 3-35: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch MBP-gp41^{*}-FkpA. Gemessen wurde der zeitliche Verlauf der Rückfaltung von 0,2 μM RCM-T1 in Gegenwart von 0, 100 und 300 nM MBP-gp41^{*}-FkpA. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 0,2 μM RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe (Daten nicht gezeigt) wurden monoexponentielle Kurven angeglichen und die daraus erhaltenen apparenten Raten der Rückfaltung in Abhängigkeit der MBP-gp41^{*}-FkpA-Konzentration aufgetragen. Aus der Steigung der Regressionsgeraden resultiert eine Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M von $1,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die katalytische Effizienz von MBP-gp41^{*}-FkpA.

Die Gründe für diese Verringerung der Aktivität können vielfältig sein. Zum einen könnte die dreidimensionale Struktur der FkpA-Einheit im Fusionskonstrukt beeinträchtigt sein, was allerdings eher unwahrscheinlich erscheint. Weiterhin könnte die natürliche Dimerisierung zweier FkpA-Moleküle in dieser Fusion gestört und somit die Aktivität vermindert sein. Allerdings gibt es bislang keine Anhaltspunkte dafür, dass die Dimerisierung eine direkte positive Auswirkung auf die Prolylisomeraseaktivität von FkpA haben könnte.

Am wahrscheinlichsten erscheint die Interpretation, dass die unmittelbare Nähe der beiden Fusionspartner MBP und gp41* anderen Proteinketten den Zugang zum aktiven Zentrum von FkpA räumlich versperrt. Weiterhin ist es durchaus möglich, dass die aggregationsanfällige Ektodomäne von gp41 zeitweise teilentfaltet vorliegt und in dieser Zeit von den chaperonaktiven Elementen von FkpA gebunden wird. Dies würde insbesondere die aggregationsunterdrückende Wirkung der FkpA-Fusion erklären. Somit stünden diese Proteinbindungsbereiche von FkpA für eine anderweitige Substratbindung nicht mehr zur Verfügung.

3.2.2.3. scFkpA₂ als Faltungshelfer

Schon vor Kenntnis der dreidimensionalen Proteinstruktur deuteten die damals vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass FkpA als Dimer vorliegen sollte (Ramm & Plückthun 2000). Außerdem stellte sich ähnlich wie im Fall von SlyD heraus, dass eine Tandemfusion FkpA-FkpA-gp41* noch besser in der Lage war, die Ektodomäne von gp41 in Lösung zu halten als die Einfachfusion FkpA-gp41* (C. Scholz, persönliche Mitteilung).

Daher war von Interesse, ob die Fixierung zweier FkpA-Module auf einer einzigen Proteinkette die Dimerisierung erleichtern und somit die enzymatischen Eigenschaften verbessern könnte. Im verwendeten Konstrukt scFkpA₂ waren die beiden FkpA-Einheiten durch einen 15 Aminosäuren langen Linker miteinander verbunden (Aminosäuresequenz im Anhang). Wie auch schon bei scSlyD₂ wurde die Erwartung, dass die erleichterte Dimerisierung von FkpA

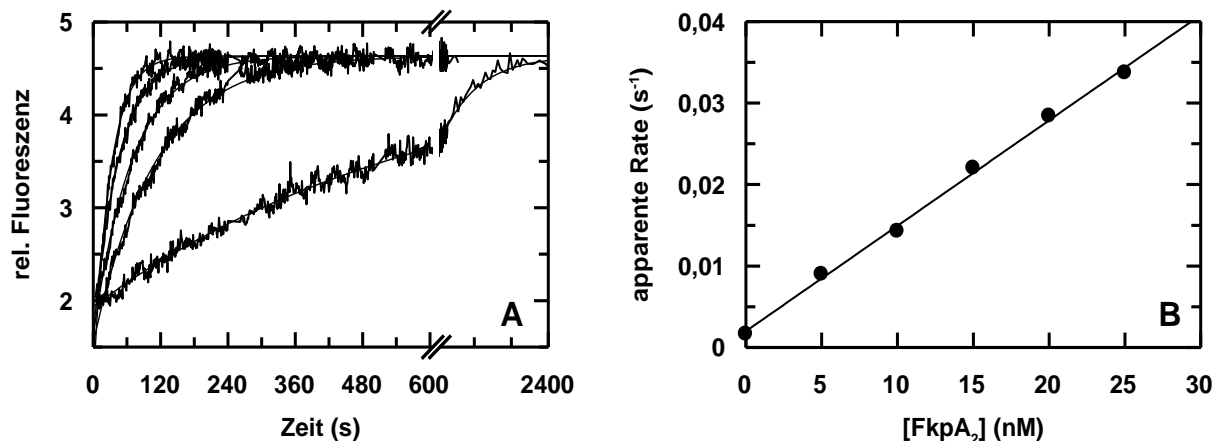


Abb. 3-36: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch scFkpA₂. (A) Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von 0,1 μM RCM-T1 in Abwesenheit (unterste Kurve) und Gegenwart von 5, 10, 15 und 25 nM scFkpA₂ (von unten nach oben). Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. RCM-T1 wurde bei 15°C in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 0,1 μM RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven). (B) Abhängigkeit der apparenten Raten der Rückfaltung von RCM-T1 von der scFkpA₂-Konzentration. Aus der Steigung der Regressionsgeraden resultiert eine Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $1,30 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die katalytische Effizienz von scFkpA₂.

in scFkpA₂ die Rückfaltungsaktivität deutlich verbessern könnte, auch in diesem Fall nicht erfüllt (s. Abb. 3-36). Zwar liegt die gemessene Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M von scFkpA₂ im RCM-T1-Rückfaltungstest mit $1,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ um etwa ein Drittel höher als die von FkpA, allerdings muss man auch hier wieder bedenken, dass pro scFkpA₂-Molekül zwei SlyD*-Module vorliegen. Die einzelnen Module im scFkpA₂-Konstrukt sind daher also weniger aktiv als im freien FkpA.

3.2.2.4. scFkpA₂ als Chaperon

Die Inhibierbarkeit der Faltungsaktivität von FkpA durch permanent entfaltetes RCM-La ließ vermuten, dass FkpA ähnlich wie SlyD und Trigger-Faktor sowohl als Isomerase als auch als Chaperon wirken könnte. Da wie oben erwähnt die Tandemfusion FkpA-FkpA-gp41* noch besser in der Lage war, die Ektodomäne von gp41 in Lösung zu halten als die Einfachfusion FkpA-gp41*, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Chaperonaktivität von scFkpA₂ im Aggregationstest mit Citratsynthase (Buchner *et al.* 1998) untersucht (Abb. 3-37).

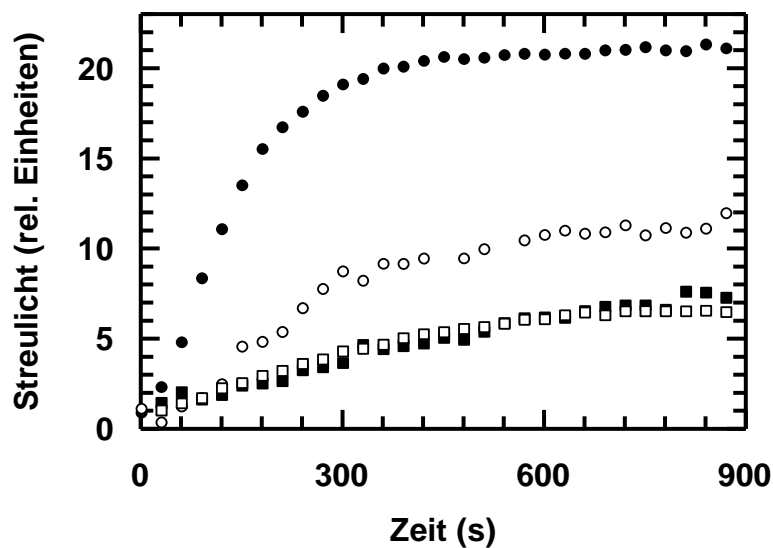


Abb. 3-37: Unterdrückung der Aggregation chaotrop denaturierter Citratsynthase durch scFkpA₂. Citratsynthase wurde bei Raumtemperatur in 6,0 M GdmCl, 20 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,7 eine Stunde lang entfaltet und anschließend 100-fach auf eine Endkonzentration von 0,15 µM (Monomer) in 60 mM GdmCl, 0,2 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,7 bei 25°C verdünnt. Die Aggregation wurde über die Zunahme des Streulichts bei 360 nm in Abwesenheit (●) und in Gegenwart von 0,30 (○), 0,75 (■) und 1,5 (□) µM scFkpA₂ beobachtet. Die Streulichtintensität von Puffer und scFkpA₂ wurde von den gemessenen Werten abgezogen.

Tatsächlich konnte durch die Gegenwart von scFkpA₂ die Aggregation denaturierter Citratsynthase verringert werden, wobei aber selbst ein zehnfacher Überschuss an scFkpA₂ nicht ausreichte, die Aggregation vollständig zu unterdrücken. Es bleibt jedoch reine Spekulation, ob FkpA deshalb tatsächlich ein schwächeres Chaperon ist als die bisher beschriebenen Proteine Trigger-Faktor und SlyD. Vermutlich sind diese Enzyme auf ihre jeweiligen Anforderun-

gen und bevorzugten Substratproteine hin optimiert, so dass ein Aggregationstest mit einem einzigen Modells substrat diese Frage nicht hinreichend klären kann.

Arié *et al.* konnten 2001 zeigen, dass FkpA die Aggregation der faltungsdefekten Variante MalE31 des Maltosebindungsproteins *in vivo* unterdrücken kann und dass diese Funktion das reife FkpA in voller Länge benötigt, dass aber die Prolylisomeraseaktivität selbst dafür nicht notwendig ist (Arie *et al.* 2001). Ähnliche Befunde zeigten auch die Arbeiten der Arbeitsgruppe Plückthun zur Rolle von FkpA bei der rekombinanten periplasmatischen Expression von *single chain*-Antikörperfragmenten (scFv) in *E. coli* (Bothmann & Plückthun 2000; Ramm & Plückthun 2000). Jedoch kamen diese Forscher zu dem Schluss, dass sowohl Isomerase- als auch Chaperonaktivität von FkpA auf der FKBP-Domäne lokalisiert seien, während die aminoterminal Domäne lediglich die Dimerisierung des Proteins vermittele (Ramm & Plückthun 2001).

2004 gelang es Saul *et al.*, die dreidimensionale Struktur des *Ec*FkpA-Dimers aufzuklären (Abb. 3-38). Dabei zeigte sich erwartungsgemäß eine ähnliche Struktur wie beim bereits bekannten MIP (Riboldi-Tunncliffe *et al.* 2001; Saul *et al.* 2004). Das FkpA-Dimer hat eine V-förmige Gestalt. Drei Helices der N-terminalen Domäne sind mit denen der anderen Untereinheit verflochten und bilden so die Dimerisierungseinheit. Die C-terminalen FKBP-Domänen

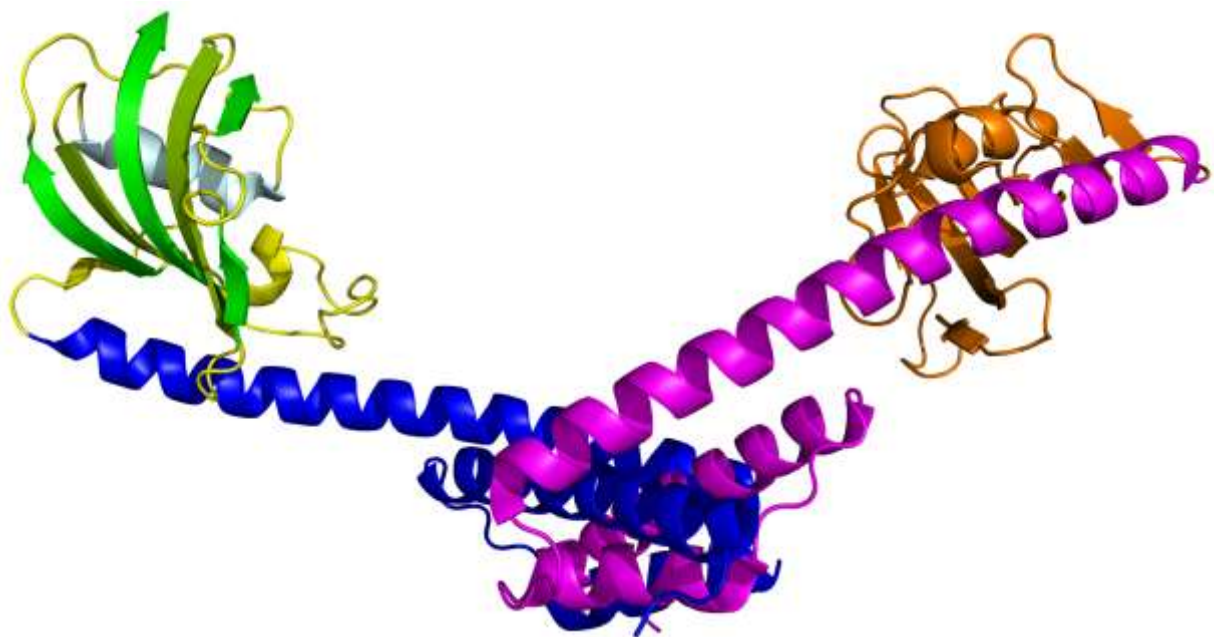


Abb. 3-38: Struktur von FkpA. Dreidimensionale Struktur des FkpA Homodimers jeweils ohne die C-terminalen 21 Aminosäuren im Bänderdiagramm. Monomer 1 ist in blau, gelb und grün, Monomer 2 in magenta und orange dargestellt. Das Dimer weist eine V-förmige Gestalt auf. Die Dimerisierung wird vermittelt durch die N-terminalen helikalen Dimerisierungsdomänen (blau bzw. magenta). An den äußeren Enden der antennenartigen Helices 3 befinden sich jeweils die beiden FKBP-Domänen (gelb/grün bzw. orange). In Monomer 1 sind die fünf antiparallelen β -Faltblattstränge grün gekennzeichnet. Faltblattstrang $\beta 5$ wird durch einen *bulge* unterbrochen. Die α -Helix zwischen den Faltblattsträngen $\beta 5$ und $\beta 2$ ist hellblau gefärbt. Die Nummerierung der β -Faltblattstränge erfolgt analog zu der in *h*FKBP12 (vgl. Abb. 3-29 A). Die Strukturdarstellungen wurden mit dem Programm PyMol (DeLano 2003) unter Verwendung der PDB-Strukturdaten 1Q6H (Saul *et al.* 2004) erstellt.

binden erwartungsgemäß FK506, befinden sich jeweils am Ende der antennenartigen langen Helix 3 und bilden so die äußeren Endpunkte des V. Verschiedene Kristallstrukturen zeigen eine hohe Flexibilität in der Orientierung der beiden FKBP-Domänen relativ zueinander. Eine Deletionsmutante ohne FKBP-Domäne war in der Lage zu dimerisieren und auch Chaperonaktivität zu zeigen, was die Autoren dieser Studie anders als Ramm und Plückthun zum Schluss führte, dass die Chaperonfunktion in der N-terminalen Domäne angesiedelt sei (Saul *et al.* 2004).

Später konnte in NMR-Experimenten gezeigt werden, dass je nach Art und Größe eines Proteinsubstrats verschiedene hydrophobe Bereiche sowohl der FKBP-Domänen als auch der Helices 3 der N-Domänen an der Bindung entfalteter Proteine beteiligt sind. Somit tragen also auch beide Domänen zur Chaperonaktivität von FkpA bei (Hu *et al.* 2006).

3.2.3. *TcFKBP18*

Wie schon für SlyD und FkpA beschrieben, konnten Fusionen mit Prolylisomerasen, die auch Chaperoneigenschaften besitzen, helfen, aggregationsempfindliche Proteine in Bakterienzellen zu exprimieren, zu reinigen und gefaltet in Lösung zu halten. Häufig erfolgt die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen bei anschließender Renaturierung, meist immobilisiert an einer Affinitätsmatrix. Typischerweise wird die Renaturierung durch schrittweise Reduktion der Konzentration an Denaturierungsmittel induziert. Hierbei ist es notwendig, dass das fusionierte Chaperon seine native dreidimensionale Struktur erlangt, bevor die Faltung des aggregationsempfindlichen Proteins selbst einsetzt. Nur so kann das Chaperon bzw. die Prolylisomerase die korrekte Faltung des gewünschten Proteins unterstützen. Daher schien es sinnvoll, nach besonders stabilen Prolylisomerasen zu suchen, deren Faltung bereits bei relativ hohen Denaturierungsmittelkonzentrationen erfolgen kann. Typischerweise findet man solche Proteine in thermophilen und hyperthermophilen Organismen.

Die Wahl fiel auf FKBP18 aus dem hyperthermophilen Archaeon *Thermococcus* sp. KS-1. Dieses wurde erstmals aus geothermisch erhitztem Meeressediment vor Japan isoliert. Seine optimale Wachstumstemperatur liegt bei 85°C. Es ist aber sogar fähig, bei Temperaturen bis zu 97°C zu überleben (Hoaki *et al.* 1994). Das Genom von *Thermococcus* sp. KS-1 kodiert für keinerlei Cyclophiline und nur für ein FKBP, das *TcFKBP18*. Dieses war das erste FKBP aus einem hyperthermophilen Organismus, das als Prolylisomerase im proteasegekoppelten Peptidtest charakterisiert werden konnte (Iida *et al.* 1998).

Die Produktion von *TcFKBP18* wird besonders durch Kälteschock induziert, beispielsweise durch einen Temperatursprung von 85°C auf 60°C. *TcFKBP18* besitzt eine hohe Chaperonaktivität gegenüber Citratsynthase: Bei 15-fachem Überschuss (5 µM gegenüber 0,33 µM

Citratsynthase) an *TcFKBP18* wird eine maximale Ausbeute (62%) an aktiver Citratsynthase erreicht. Bei noch höherem Überschuss wird zwar jegliche Aggregation von Citratsynthase unterdrückt, die Ausbeute an aktivem Protein nimmt jedoch wieder ab, vermutlich aufgrund der Bildung stabiler multimerer Komplexe mit *TcFKBP18* (Ideno *et al.* 2001).

TcFKBP18 zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit mit *MtFKBP17* und *SlyD* (s. Abb. 3-28). Daher kann man davon ausgehen, dass seine Struktur der von *MtFKBP17* (Suzuki *et al.* 2003) sehr ähnlich sein dürfte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Prolylisomeraseaktivität von *TcFKBP18* im Proteinrückfaltungstest bestimmt. Wie schon beim Trigger-Faktor aus *T. maritima* (s. Kapitel 3.1.8.) war auch die Faltungshelferaktivität von *TcFKBP18* unter den Standardtestbedingungen der Rückfaltung von RCM-T1 (15°C) äußerst gering. Um die Aktivität auch bei höheren Temperaturen bestimmen zu können, wurde wieder die stabilere Variante RCAM-T1(4X) bei 3 M NaCl und pH 6,0 als Testsubstrat eingesetzt. So waren neben 15°C auch 25°C und 35°C als Messbedingungen zugänglich.

Die Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M für die katalytische Effizienz von *TcFKBP18* bei diesen drei Temperaturen sind mit den Vergleichswerten für den Trigger-Faktor aus *T. maritima* in Tabelle 3-3 angegeben. Im Vergleich zum *TmTF* ist die Aktivität von *TcFKBP18* um Faktor 3 bis 4 höher, allerdings immer noch deutlich niedriger als die des Trigger-Faktor aus *E. coli* (vgl. Tabelle 3-1). Die Aktivität nimmt mit jeder Temperaturerhöhung um 10 K um Faktor 5

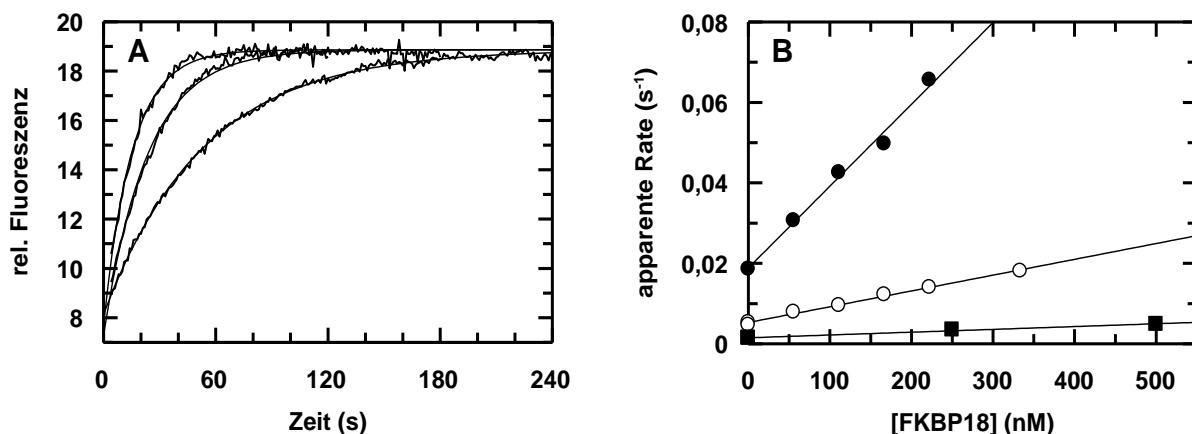


Abb. 3-39: Katalyse der Rückfaltung von RCAM-T1(4X) durch *TcFKBP18*.

(A) Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von 0,5 μM RCAM-T1(4X) in Abwesenheit (unterste Kurve) und Gegenwart (von unten nach oben) von 111 nM und 222 nM *TcFKBP18*. Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. RCAM-T1(4X) wurde bei 35°C in 100 mM MES pH 6,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 0,5 μM RCAM-T1(4X) in 3,0 M NaCl, 100 mM MES pH 6,0 bei 35°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven).

(B) Abhängigkeit der apparenten Raten der Rückfaltung von RCAM-T1(4X) von der *TcFKBP18*-Konzentration bei 15°C (■), 25°C (○) und 35°C (●). Aus der Steigung der Regressionsgeraden resultieren Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M von $7,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (15°C), $4,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (25°C) und $2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (35°C) für die katalytische Effizienz des *TcFKBP18*.

bis 6 zu. Höhere Temperaturen sind für diese Messung nicht zugänglich. Die Vermutung liegt daher auch hier nahe, dass sich die Aktivität des *TcFKBP18* bei weiterer Temperaturerhöhung auch noch weiter steigern würde, so dass auch *TcFKBP18* Aktivitätswerte vergleichbar mit denen von *EcTF* oder *EcSlyD* erreichen dürfte.

Tabelle 3-3: Prolylisomeraseaktivität von *TcFKBP18* und *TmTF* im RCAM-T1(4X) Rückfaltungstest

Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	15°C	25°C	35°C
<i>TcFKBP18</i>	7.000	39.000	203.000
<i>TmTF</i>	1.700	10.700	68.000

Gemessen wurde die Enzymaktivität bei der Rückfaltung von 500 nM RCAM-T1(4X) in 3,0 M NaCl, 100 mM MES pH 6,0 (vgl. Abb. 3-39 und Abb. 3-26).

Die Hoffnung, mit diesem thermostabilen *TcFKBP18* als Fusionspartner die Löslichkeit der HIV-1 gp41^{*}-Ektodomäne erhöhen zu können, wurde nicht erfüllt. Anders als das SlyD^{*}-gp41^{*}-Fusionsprotein, das nach matrixgekoppelter Rückfaltung gut löslich blieb, aggregierte das *TcFKBP18*-gp41^{*}-Konstrukt sehr schnell (Scholz *et al.* 2006). Woher dieser starke Unterschied der beiden strukturell vermutlich sehr ähnlichen Isomerasen herrührt, ist bis heute unklar. Möglicherweise verhindert die bei niedrigen Temperaturen zu erwartende „Steifigkeit“ des thermostabilen *TcFKBP18* eine effiziente Funktion als Faltungshelfer.

Dieses Problem tritt jedoch bei *TcFKBP18* nicht generell auf. So konnte später gezeigt werden, dass *TcFKBP18* als Fusionspartner von Rhodanese und von zwei verschiedenen Maus-Antikörperfragmenten deren lösliche Ausbeute bei Expression in *E. coli* signifikant erhöhen kann (Ideno *et al.* 2004). Dies deutet darauf hin, dass die Chaperoneigenschaften von *TcFKBP18* durchaus auch bereits bei mittleren Temperaturen zum Tragen kommen können.

3.2.4. *NcFKBP22*

Der Gruppe von Maximilian Tropschug an der Universität Freiburg gelang es 1999 mittels Affinitätschromatographie an dem FK506-Homolog Ascomycin ein neues FKBP aus dem Schimmelpilz *Neurospora crassa* zu isolieren. Wie sich später herausstellte, ist dies eines von insgesamt vier verschiedenen FKBP in diesem Pilz (Pinto *et al.* 2008). Das Protein wird als 217 Aminosäuren langes Vorläuferprotein synthetisiert. Eine 20 Aminosäuren lange Signalsequenz wird nach dem Import ins Endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten. Im ER verbleibt dann das reife Protein aus 197 Aminosäuren mit einer rechnerischen Molekülmasse von 20.912 Da. Da die Massenspektroskopie des affinitätsgereinigten Proteins jedoch eine Molekülmasse von 22.043 Da ergab, wurde das Protein von den Entdeckern *NcFKBP22* genannt.

Grund für diese Massendifferenz dürfte eine posttranslationale Glycosilierung sein (Solscheid & Tropschug 2000).

C-terminal von der FKBP-Domäne (Reste 1-115 des reifen Proteins) befindet sich eine Sequenz (Reste 116-197), in der sich zahlreiche saure Aminosäuren befinden (14 Glutaminsäuren und 5 Asparaginsäuren) und zu der bislang in keinem anderen FKBP ein homologes Motiv gefunden werden konnte. Sekundärstrukturvorhersagen ließen auf eine amphipathische Helix schließen (Solscheid & Tropschug 2000).

Hier war nun von Interesse, ob diese neuartige Proteindomäne wie bei den anderen in dieser Arbeit beschriebenen Prolylisomerasen dazu beitragen könnte, die Affinität zu entfalteten Proteinsubstraten zu erhöhen und so die katalytische Effizienz des Gesamtproteins zu ver-

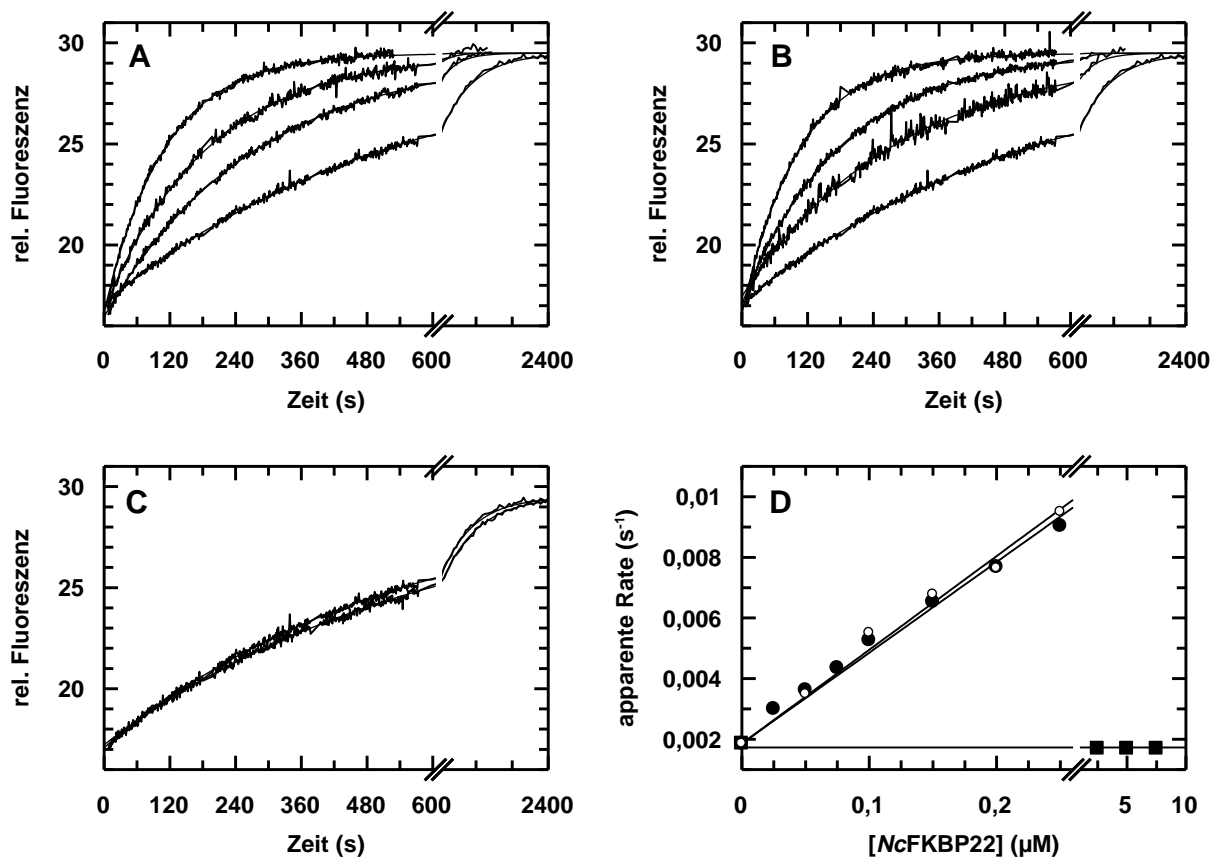


Abb. 3-40: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1 durch NcFKBP22 und seine isolierten Domänen. (A)-(C) Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von 0,5 μ M RCM-T1 in Abwesenheit (unterste Kurve) und Gegenwart von (von unten nach oben) 50, 100 und 250 nM NcFKBP22 (A), von 50, 100 und 250 nM NcFKBP22-NT (B) sowie von 5 μ M NcFKBP22-CT (C). Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. RCM-T1 wurde bei 15°C in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 0,5 μ M RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven). (D) Abhängigkeit der apparenten Raten der Rückfaltung von RCM-T1 von der Konzentration an NcFKBP22 bzw. seiner isolierten Domänen. Aus der Steigung der Regressionsgeraden resultieren Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M von $3,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $3,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die katalytische Effizienz von NcFKBP22 (●), NcFKBP22-NT (○) und NcFKBP22-CT (■).

bessern. Daher wurde das Volllängenprotein *NcFKBP22* (1-197) sowie dessen isolierte Domänen *NcFKBP22*-NT (1-115) und *NcFKBP22*-CT (116-197) im RCM-T1-Rückfaltungstest eingesetzt. Alle drei Konstrukte waren von der Arbeitsgruppe Tropschug mit jeweils einem N-terminalen Hexa-Histidin-*tag* rekombinant in *E. coli* produziert worden und trugen daher keine Glycosylierungen.

Abbildung 3-40 zeigt die Rückfaltung von RCM-T1 in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an *NcFKBP22*, *NcFKBP22*-NT und *NcFKBP22*-CT. Wie sich aus der Auftragung der apparenten Raten der Rückfaltung entnehmen lässt, besitzen das Volllängenprotein *NcFKBP22* sowie die isolierte FKBP-Domäne *NcFKBP22*-NT in diesem Test nahezu identische katalytische Effizienzen von $3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, während die C-terminale Domäne allein keinerlei Aktivität als Prolylisomerase aufweist. Die Gegenwart dieser Domäne im Volllängenprotein hat keinerlei effizienzsteigernde Auswirkung auf die Isomerasedomäne, anders als zusätzliche (Chaperon-)Domänen bei den anderen in dieser Arbeit beschriebenen Prolylisomerasen. Daher liegt der Schluss nahe, dass die C-terminale Domäne in *NcFKBP22* auch keine Chaperonfunktion besitzt.

Diese Annahme sollte mit Hilfe des Citratsynthase-Aggregationstests für alle drei zur Verfügung stehenden *NcFKBP22*-Konstrukte überprüft werden. Abbildung 3-41 zeigt anhand der Streulichtzunahme die Aggregation von Citratsynthase in Abwesenheit und Gegenwart von 0,3 und 1,5 μM des Volllängenproteins *NcFKBP22*. Anders als bei effizienten Chaperonen üblich nimmt die Streulichtintensität in Gegenwart von *NcFKBP22* hier sogar noch stärker zu.

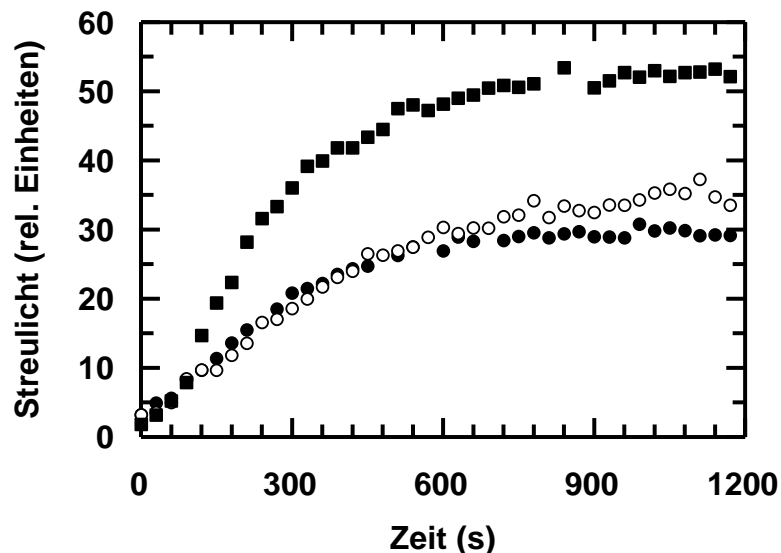


Abb. 3-41: Aggregation chaotrop denaturierter Citratsynthase in Gegenwart von *NcFKBP22*. Citratsynthase wurde bei Raumtemperatur in 6,0 M GdmCl, 20 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,7 eine Stunde lang entfaltet und anschließend 100-fach auf eine Endkonzentration von 0,15 μM (Monomer) in 60 mM GdmCl, 0,2 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,7 bei 25°C verdünnt. Die Aggregation wurde über die Zunahme des Streulichts bei 360 nm in Abwesenheit (●) und in Gegenwart von 0,3 (○) und 1,5 μM (■) *NcFKBP22* beobachtet. Die Streulichtintensität von Puffer und scSlyD₂ wurde von den gemessenen Werten abgezogen.

Bei den beiden isolierten Domänen war dieser Effekt sogar noch stärker ausgeprägt (Daten nicht gezeigt). Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die gemessene Lichtstreuung kein direktes Maß für die Menge an gebildetem Aggregat sein kann. Die Lichtstreuung hängt nicht nur von der Konzentration an Proteinaggregaten, sondern sehr stark von der Größe dieser lichtstreuenden Partikel ab. So kann beispielsweise die Gegenwart bereits bestehender Proteinaggregate zu Beginn der Reaktion bewirken, dass diese als Aggregationskeime für die Anlagerung entfalteter Citratsynthasemoleküle dienen und sich so statt vieler kleiner eine niedrigere Anzahl größerer lichtstreuender Partikel bildet und die Lichtstreuung dadurch effektiv höher ausfällt. Bei den vorliegenden Proben an *NcFKBP22*, *NcFKBP22*-NT und *NcFKBP22*-CT dürfte dies durchaus der Fall gewesen sein, wie die Absorptionsspektren der verwendeten Proben zeigen (Abb. 3-42).

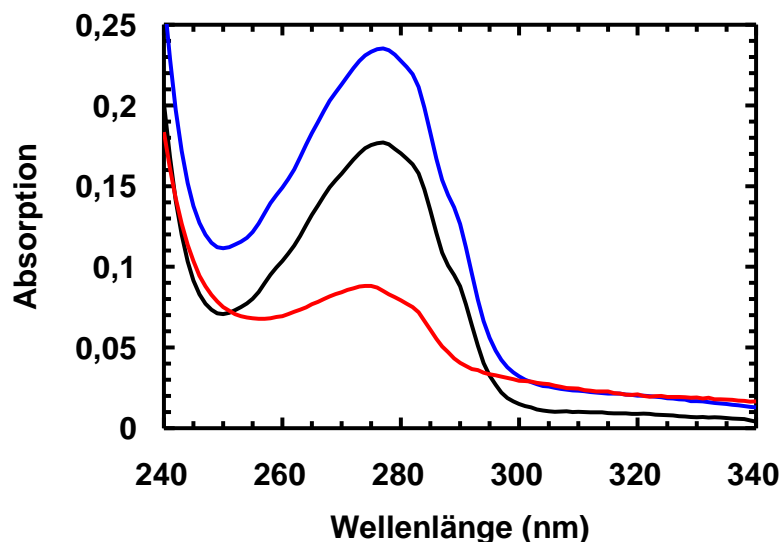


Abb. 3-42: Absorptionsspektren von *NcFKBP22* (—) und *NcFKBP22*-NT (—) und *NcFKBP22*-CT (—). Aufgezeichnet wurden die Absorptionsspektren von 1:10-Verdünnungen der zur Verfügung stehenden Stammlösungen in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 bei 20°C in Quarzglasküvetten mit Beobachtungsschichtdicke 1 cm.

In allen drei Proteinlösungen fällt eine deutliche Absorption auch im Wellenlängenbereich oberhalb von 305 nm auf. Bei aggregatfreien Proteinlösungen sollte die Absorption dort null sein. Offensichtlich enthielten also alle drei zur Verfügung gestellten Proben bereits signifikante Konzentrationen an Proteinaggregaten, die dann im Chaperontest die Bildung noch größerer Aggregatpartikel und somit die erhöhte Lichtstreuung bewirkt haben dürften. Im Rahmen dieser Arbeit konnte daher für *NcFKBP22* und seine isolierten Domänen keine Chaperonaktivität nachgewiesen werden, was aber durchaus auf die vorgelegene Probenqualität zurückzuführen sein dürfte.

Später konnte die Gruppe von Maximilian Tropschug zeigen, dass *NcFKBP22* als Homodimer vorliegt und diese Dimerisierung über die Wechselwirkung der helikalen C-Domänen

vermittelt wird, anders als beispielsweise bei FkpA oder Mip, wo die Dimerisierung über helikale N-terminale Domänen bewirkt wird. Abweichend von den Resultaten dieser Arbeit konnte auch eine deutliche aggregationsunterdrückende Chaperonfunktion von NcFKBP22 festgestellt werden. Diese stammt primär von der FKBP-Domäne, tritt aber nur im Volllängenprotein auf. Es zeigte sich weiterhin, dass die FKBP-Domäne mit BiP, dem wichtigsten Hsp70-Chaperon im ER, wechselwirkt und dass diese Wechselwirkung die Chaperonaktivität von NcFKBP22 verstärkt (Tremmel & Tropschug 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass NcFKBP22 eine essentielle Rolle bei der Bildung der Microconidiphoren und somit bei der asexuellen Vermehrung von *Neurospora crassa* spielt (Tremmel *et al.* 2007).

3.2.5. SurA

SurA ist eine Prolylisomerase aus dem Periplasma von *E. coli* und ein wichtiger Hilfsfaktor bei der korrekten Faltung von Proteinen der äußeren Zellmembran (OMPs = *outer membrane proteins*).

Die äußere Zellmembran (OM) ist ein sehr komplexes System, das einerseits die Zelle vor dem Eindringen unerwünschter Substanzen (z.B. Antibiotika) schützen, andererseits aber auch den nötigen Austausch mit der Umwelt (z.B. Aufnahme von Nahrung, Abgabe von Abfallprodukten) gewährleisten muss. Daher ist für die korrekte Funktion der OM eine ausgewogene Zusammensetzung aus den verschiedensten Lipiden, Lipopolysacchariden und OMPs dringend notwendig und eine Störung dieser Balance kann für das Überleben der Zelle fatale Folgen haben. Daher kann die Deletion eines einzelnen an der Faltung von OMPs beteiligten Faktors gravierende Phänotypen hervorrufen. Tormo *et al.* berichteten 1990, dass das Gen *surA* bei Vorliegen einer Mutation im Sigma-Faktor der stationären Phase (σ^S) für das Überleben (*survival*) von *E. coli* in der stationären Phase essentiell ist (Tormo *et al.* 1990).

Vor den Experimenten dieser Arbeit war bekannt, dass SurA eine wichtige Rolle bei der korrekten Reifung der trimeren OM-Porine LamB, OmpA, OmpC und OmpF spielt. SurA-defiziente Stämme zeigen die typischen Anzeichen einer gestörten Zellhülle wie Lyse auf Kulturplatten oder erhöhte Empfindlichkeit gegenüber hydrophoben Substanzen (z.B. SDS/EDTA oder Rifampicin). Außerdem ist in diesen Zellen die σ^E -abhängige Stressantwort permanent aktiviert (Lazar & Kolter 1996; Missiakas *et al.* 1996; Rouviere & Gross 1996).

Sequenzvergleiche hatten ergeben, dass SurA neben bislang unbekannten C-terminalen und N-terminalen Bereichen zwei Parvulin-homologe Domänen besitzt. Rouvière und Gross konnten im proteasegekoppelten Peptidtest zeigen, dass nur die zweite dieser parvulinähnlichen Domänen (Par II) eine detektierbare Prolylisomeraseaktivität besitzt, diese jedoch um zwei Zehnerpotenzen niedriger liegt als die von Parvulin selbst (Rouviere & Gross 1996).

Susanne Behrens und Carol A. Gross (UC San Francisco, USA) wollten nun herausfinden, welche Proteinregionen und Aktivitäten von SurA für seine wichtige Funktion *in vivo* am bedeutendsten sind und durch welche SurA-Bestandteile sich die schwerwiegenden Effekte einer *surA* Mutation aufheben lassen. Besonderes Augenmerk sollte auf die Frage gelegt werden, ob die Prolylisomeraseaktivität des Enzyms dabei eine entscheidende Rolle spielt. Bei den bisherigen Isomerasemessungen im chymotrypsingekoppelten Peptidtest hatte sich gezeigt, dass SurA und seine verschiedenen Teilkonstrukte sehr schnell von Chymotrypsin abgebaut wurden (S. Behrens, persönliche Mitteilung). Daher entstand eine Kooperation mit unserer Gruppe, um die Prolylisomeraseaktivitäten der diversen SurA-Konstrukte im proteasefreien RCM-T1-Rückfaltungstest zu ermitteln. Außerdem wurde von mir für einige dieser Konstrukte auch nochmals die Prolylisomeraseaktivität im chymotrypsingekoppelten Peptidtest bestimmt, sofern die vorhandene Proteinmenge dafür ausreichte. Eine schematische Darstellung aller in dieser Arbeit verwendeten SurA-Konstrukte einschließlich der hierfür verwendeten Kurzbezeichnungen findet sich in Abbildung 3-43. Von Interesse war es insbesondere, eine strukturell intakte Variante von SurA mit inaktivierter Isomerasefunktion zu testen.

Aus Arbeiten mit der parvulinähnlichen Domäne von Pin1 war bereits eine Mehrfachmutation bekannt, die die Prolylisomeraseaktivität von Pin1 unter die Nachweisgrenze erniedrigen konnte (Lu *et al.* 1996). Daher wurden nach einem Sequenzalignment in den Varianten

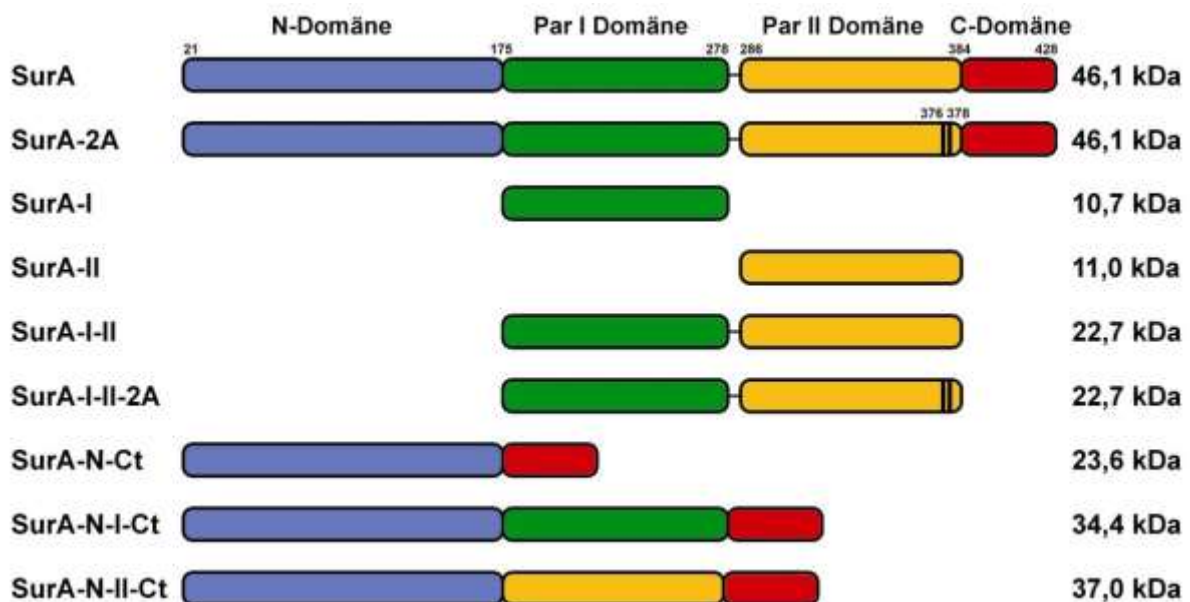


Abb. 3-43: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten SurA-Varianten. Dargestellt sind die reifen Proteine ohne Signalsequenz (Aminosäuren 1-20) und das rechnerische Molekulargewicht. Die Aminosäurenummern beziehen sich auf die Sequenz des unprozessierten SurA-Proteins. Farbcode: N-terminale Domäne: blau, parvulinähnliche Domäne I: grün, parvulinähnliche Domäne II: ocker, C-terminale Domäne: rot. Eine inaktivierende doppelte Alaninsubstitution in der parvulinähnlichen Domäne II ist durch einen senkrechten Doppelstrich dargestellt (SurA-2A und SurA-I-II-2A).

SurA-2A bzw. SurA-I-II-2A die entsprechenden Reste His376 und Ile378 jeweils durch Alanin ersetzt, wodurch die Prolylisomeraseaktivität dieser Varianten theoretisch zerstört sein sollte.

Exemplarisch für alle in dieser Arbeit charakterisierten SurA-Konstrukte sind in Abbildung 3-44 einige Zeitverläufe für die Wildtyp-SurA-katalysierte Prolylisomerisierung im chymotrypsingekoppelten Peptidtest (Abb. 3-44 A) und im RCM-T1-Rückfaltungstest

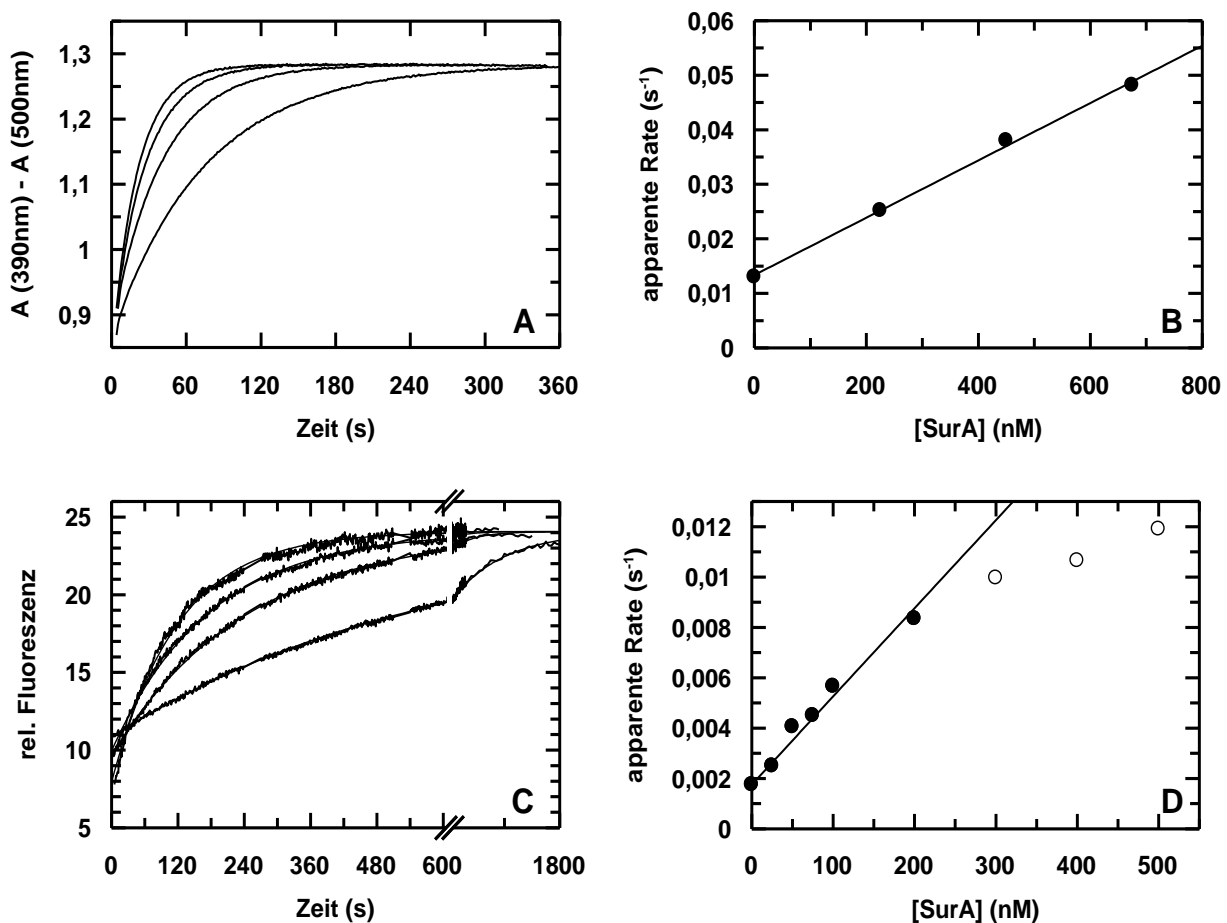


Abb. 3-44: Katalyse der Prolylisomerisierung durch SurA. (A) Zeitlicher Verlauf der *cis-trans*-Isomerisierung von Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA in Abwesenheit (unterste Kurve) und Gegenwart von 225 nM, 450 nM und 675 nM SurA (von unten nach oben). Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung des Testsubstrats auf 78 µM in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C in Gegenwart von 30 µM Chymotrypsin und über die Absorption bei 390 nm (abzüglich der Absorption bei 500 nm als interner Referenz) beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen. (B) Abhängigkeit der apparenten Raten der Isomerisierung des Peptidsubstrats von der SurA-Konzentration bei 15°C. Aus der Steigung der Regressionsgeraden resultiert eine Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M von $5,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die katalytische Effizienz von SurA. (C) Zeitlicher Verlauf der Rückfaltung von 0,5 µM RCM-T1 in Abwesenheit (unterste Kurve) und Gegenwart von 50, 100 und 200 nM SurA (von unten nach oben). Die Kurven sind auf identische Endwerte normiert. RCM-T1 wurde bei 15°C in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 60 min entfaltet. Die Rückfaltung wurde initiiert durch 100-fache Verdünnung auf 0,5 µM RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C und über die Fluoreszenzänderung bei 320 nm beobachtet. An die Fluoreszenzverläufe wurden monoexponentielle Kurven angeglichen (dünne Kurven). (D) Abhängigkeit der apparenten Raten der Rückfaltung von RCM-T1 von der SurA-Konzentration. Aus der Steigung der Regressionsgeraden resultiert eine Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M von $3,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die katalytische Effizienz von SurA.

(Abb. 3-44 C) gezeigt. Wie schon zuvor von Susanne Behrens wurde für den chymotrypsin-gekoppelten Test das Standardsubstrat Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNitroanilin (Fischer *et al.* 1992; Rahfeld *et al.* 1994a) verwendet. Allerdings erfolgte die Messung nicht wie zuvor bei 4°C, sondern bei 15°C, um besser mit den Resultaten aus den RCM-T1-Rückfaltungstests bei ebenfalls 15°C vergleichen zu können.

Wie üblich erfolgte die Berechnung der Spezifitätskonstanten durch einen linearen Anstieg an die ermittelten apparenten Raten der gemessenen Zeitverläufe (Abb. 3-44 B und D). Diejenigen Raten bei höheren Enzymkonzentrationen, die vom linearen Verlauf abwichen, wurden bei der Bestimmung der Spezifitätskonstanten nicht berücksichtigt (Abb. 3-44 D, ○). Die ermittelten Spezifitätskonstanten für die katalytische Effizienz von SurA lagen bei $5,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ im Peptidtest und bei $3,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ im RCM-T1-Rückfaltungstest. Der Wert aus dem Peptidtest liegt 55% über dem von Susanne Behrens mitgeteilten ($3,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und lässt sich durch den Temperaturunterschied (15°C gegenüber 4°C) erklären.

Die Spezifitätskonstanten für alle in dieser Arbeit charakterisierten Konstrukte von SurA finden sich in Tabelle 3-4, wobei zu beachten ist, dass bei Enzymen mit katalytischen Effizienzen von mehr als $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ im RCM-T1-Rückfaltungstest die Konzentration an RCM-T1 0,5 µM betrug, während sie bei Konstrukten mit geringerer Aktivität auf 2,0 µM erhöht werden musste, um angesichts der hohen benötigten Enzymkonzentrationen ein ausreichendes Signal/Rausch-Verhältnis zu erzielen.

Bei Betrachtung der ermittelten Spezifitätskonstanten fällt auf, dass die Werte aus den Peptidtests und dem RCM-T1-Rückfaltungstest beim Volllängenprotein SurA in der gleichen

Tabelle 3-4: Prolylisomeraseaktivität von SurA und seinen Derivaten

Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Peptidtest 4°C ¹	Peptidtest 15°C ²	RCM-T1-Rückfaltungstest ³
SurA	34.000	53.000	35.000
SurA-2A	nicht detektierbar	nicht detektierbar	310
SurA-I	nicht detektierbar	nicht bestimmt	nicht detektierbar
SurA-II	22.000	58.000	370
SurA-I-II	30.000	nicht bestimmt	12.000
SurA-I-II-2A	nicht detektierbar	55	37
SurA-N-Ct	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht detektierbar
SurA-N-I-Ct	nicht detektierbar	nicht bestimmt	420
SurA-N-II-Ct	28.000	36.000	62.000

¹ Gemessen wurde von Susanne Behrens die Enzymaktivität im chymotrypsin-gekoppelten Peptidtest mit dem Tetrapeptid Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA bei 4°C (ähnlich wie in Abb. 3-44 A und B).

² Gemessen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Enzymaktivität im chymotrypsin-gekoppelten Peptidtest mit dem Tetrapeptid Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA bei 15°C (vgl. Abb. 3-44 A und B).

³ Gemessen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Enzymaktivität bei der Rückfaltung von 0,5 µM bzw. 2,0 µM RCM-T1 in 2,0 M NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 bei 15°C (vgl. Abb. 3-44 C und D).

Größenordnung liegen, aber insbesondere die Aktivität im Rückfaltungstest um ein bis zwei Größenordnungen schwächer ist als diejenige guter Prolylisomerasen wie Trigger-Faktor oder SlyD.

Besondere Vorsicht ist geboten bei der Interpretation von Aktivitätswerten, die unterhalb von $500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ liegen. Hierbei könnte es sich einerseits um die tatsächliche Prolylisomeraseaktivität der betrachteten SurA-Konstrukte, möglicherweise aber auch um eine Störung durch geringste Spuren von anderen potenteren Prolylisomerasen handeln. Sämtliche hier betrachteten Konstrukte wurden als Fusion mit einem Hexa-Histidin-tag in *slyD⁻/surA⁻* Stämmen produziert und über Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA Affinitätsmatrix gereinigt. Allerdings kann keine Proteinreinigung 100,0 % reines Protein erbringen. So würde beispielsweise eine Verunreinigung der Charge mit weniger als 1 Promille Proteinmassenanteil an Trigger-Faktor solche geringen Prolylisomeraseaktivitäten bewirken.

Betrachtet man also die geringe Aktivität der Variante SurA-2A, so gibt es für die Restaktivität von ca. 1% bezogen auf das Wildtypprotein drei plausible Interpretationen:

- Die Doppelmutation in der Variante vermag die Prolylisomeraseaktivität der parvulinähnlichen Domäne II nur um ca. 99% zu vermindern, aber nicht vollständig zu zerstören.
- Die bisher für inaktiv gehaltene parvulinähnliche Domäne I ist nicht vollständig inaktiv im RCM-T1-Rückfaltungstest. Dafür könnte sprechen, dass auch das Konstrukt SurA-N-I-Ct eine ähnliche Prolylisomeraseaktivität zeigt.
- Die Restaktivität in den beiden genannten Proben stammt von minimalen Verunreinigungen mit einer anderen Prolylisomerase.

Besonders auffällig ist, dass die isolierte parvulinähnliche Domäne II (SurA-II) im RCM-T1-Test ebenfalls nur etwa 1% der Aktivität des Volllängenproteins SurA zeigt. Um sicherzugehen, dass es sich hierbei nicht um eine beschädigte Charge handelte, wurde der Test wiederholt und parallel dazu die Aktivität der Charge im chymotrypsingekoppelten Peptidtest bestimmt. Der erneute Rückfaltungstest bestätigte das bisherige Ergebnis, während die Aktivität im Peptidtest mit $5,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sogar noch minimal höher lag als die von komplettem SurA. Offenbar besitzt die Domäne II also die volle Prolylisomeraseaktivität. Um aber bei der Rückfaltung von ganzen Proteinen das volle Isomerasepotential auszuschöpfen, benötigt sie noch die Unterstützung durch andere Komponenten von SurA.

Diese unterstützende Rolle können offenbar zwei verschiedene Segmente übernehmen: Durch Anhängen der parvulinähnlichen Domäne I (SurA-I-II) steigt die Faltungsaktivität bereits wieder auf ein Drittel des Volllängenproteins. Durch Anhängen der N- und C-terminalen Sequenzen (SurA-N-II-Ct) lässt sich sogar eine Faltungsaktivität erzielen, die über die des Wildtypproteins SurA hinausgeht.

Die Ergebnisse der Rückfaltungsstudien lassen den Schluss zu, dass sowohl die Domäne I als auch die N- und C-terminalen Bereiche die Affinität des Enzyms für entfaltete Proteinsubstrate erhöhen. Somit lag die Vermutung nahe, dass die beschriebenen Bereiche auch Chaperonaktivität besitzen sollten. Diese Annahme wurde durch Tests von Susanne Behrens bestätigt. In Lichtstreuungsmessungen konnte sie zeigen, dass SurA, SurA-N-Ct, SurA-N-I-Ct und SurA-N-II-Ct die Aggregation rückfaltender Citratsynthase signifikant verringern, wobei SurA-N-I-Ct und SurA-N-II-Ct die stärkste Chaperonaktivität dieser vier Konstrukte aufweisen. Keine Wirkung zeigten in diesen Tests jedoch die Einzeldomänen SurA-I und SurA-II sowie das Konstrukt SurA-I-II (Behrens *et al.* 2001).

Die Tatsache, dass insbesondere die N- und C-terminalen Bereiche die Bindungsfähigkeit für entfaltete Proteine verbessern, kann erklären, warum die Domäne II nur in Gegenwart dieser beiden Segmente auch ihre maximale Faltungsaktivität im RCM-T1-Test erreicht. Erstaunlich ist allerdings, dass SurA-I-II zwar eine relativ hohe Faltungsaktivität, jedoch keine Chaperonaktivität zeigt. Allerdings ist es auch nicht legitim, die Bindungsfähigkeit für entfaltete Citratsynthase mit der für entfaltete RCM-T1 gleichzusetzen. Es ist durchaus denkbar, dass die zusätzliche Domäne I die Affinität für RCM-T1 erhöht, nicht aber in ausreichendem Maße diejenige für Citratsynthase.

Von besonderem Interesse für die kooperierende Gruppe in San Francisco war ja die Frage, welche Proteinregionen und Aktivitäten von SurA für seine Funktion *in vivo* am bedeutendsten sind und durch welche SurA-Bestandteile sich die schwerwiegenden Effekte einer *surA*⁻ Mutation aufheben lassen. Dies wurde durch Expression der hier beschriebenen Varianten in *surA*⁻ *E. coli* Zellen überprüft. Alle Konstrukte trugen hierbei zusätzlich die 20 Aminosäuren lange N-terminale Signalsequenz zum Export ins Periplasma, welche nach erfolgtem Export proteolytisch abgespalten wurde.

Beobachtet wurden zweierlei Kriterien:

- Zum einen die σ^E -abhängige Stressantwort. Wie bereits erwähnt, ist in *surA*⁻ Zellen diese Stressantwort permanent aktiviert. Es wurden *surA*⁻ Zellen verwendet, die eine einmalige chromosomale Kopie der Reportergenfusion $\Phi\lambda$ [rpoHP3::lacZ] für β -Galactosidase trugen. Die messbare β -Galactosidaseaktivität dieser Zellen war somit ein Maß für die σ^E -Aktivität in den Zellen. Sank bei Expression eines SurA-Konstrukts in diesen Zellen die β -Galactosidaseaktivität, so war dies ein Zeichen dafür, dass das exprimierte SurA-Konstrukt den *knock out* von SurA supprimieren kann.
- Zum anderen die Fähigkeit von *surA*⁻ Zellen, auf Kulturmedien mit SDS/EDTA zu wachsen. Wie erwähnt sind *surA*⁻ Zellen deutlich anfälliger für SDS/EDTA und wachsen daher deutlich schlechter auf SDS/EDTA-Medien als Wildtypzellen. Auch hier wurde beobachtet, welche plasmidal-kodierten SurA-Konstrukte diesen Phänotyp unterdrücken konnten.

In beiden hier beschriebenen Testsystemen waren Vollängen-SurA, sowie diejenigen Konstrukte, die mindestens die N-terminale und die C-terminale Sequenz trugen, in der Lage, den *surA*⁻ Phänotyp zu unterdrücken. Bereits das Minimalkonstrukt SurA-N-Ct reichte dafür aus. Die Gegenwart der isomeraseaktiven Domäne II spielte hingegen ebenso wenig eine Rolle wie die Gegenwart oder Abwesenheit der inaktivierenden 2A-Mutation. Für die detektierbare *in vivo* Funktion von SurA sind also ausschließlich die chaperonaktiven Bestandteile von SurA verantwortlich. Die Prolylisomeraseaktivität spielt in diesem Zusammenhang keine Rolle (Behrens *et al.* 2001).

Erstaunlich war im Fall von SurA, warum die C- und N-terminalen Bereiche nur gemeinsam zu signifikanten Effekten führten. Die Aufklärung der Proteinstruktur von SurA (s. Abb. 3-45) im November 2002 brachte die Lösung dieser Frage (Bitto & McKay 2002): Beide Bereiche bilden eine gemeinsame Strukturdomäne, die nur durch beide Komponenten stabil ist. Unmittelbar daneben befindet sich die parvulinähnliche Domäne I, deren Zugang zum aktiven Zentrum in diesem Komplex besonders durch die Helix der C-Domäne verdeckt wird. Zusammen bilden alle drei Segmente die so genannte „Kerndomäne“ von SurA, während die katalytisch aktive parvulinähnliche Domäne II mit dieser über zwei lange flexible Linker verbunden ist.

Zwischenzeitlich wurden in anderen Organismen auch SurA-Homologe mit nur einer und sogar ohne parvulinähnliche Domäne identifiziert (Alcock *et al.* 2008; Giuseppe *et al.* 2011). Man kann daher SurA-N-Ct als „Minimalchaperon“ für die Funktion von SurA *in vivo* betrachten.

Auch bei SurA zeigt sich wieder ein schon bei mehreren anderen Prolylisomerasen dieser Arbeit beobachtetes Prinzip: Die Aktivität einer Isomasedomäne wird verbessert durch Kombination mit einem Chaperonmodul, welches entfaltete Proteinketten (und somit potentielle Isomerase substrate) bindet und dadurch vermutlich die effektive Konzentration von entfalten Proteinsubstraten im Umfeld des aktiven Zentrums stark erhöht.

Die Tatsache, dass die Prolylisomeraseaktivität nicht ausschlaggebend ist für die Funktion von SurA *in vivo*, bedeutet nicht, dass diese Funktion generell redundant wäre. Vermutlich hilft das Zusammenspiel von Chaperon- und Prolylisomerasefunktion in SurA, die Faltungseffizienz im Periplasma zu optimieren. Während ein Ausfall der Chaperonfunktion zu dem beschriebenen deutlichen Phänotyp führt, kann der Ausfall der Prolylisomerasefunktion von SurA von den anderen periplasmatischen Prolylisomerasen zumindest soweit kompensiert werden, dass kein starker von außen zu beobachtender Effekt eintritt. Dies kann aber durchaus für die Zelle bedeuten, dass sie einen höheren Aufwand zur Aufrechterhaltung des Milieus im Periplasma und zur korrekten Zusammensetzung der äußeren Zellmembran betreiben muss.

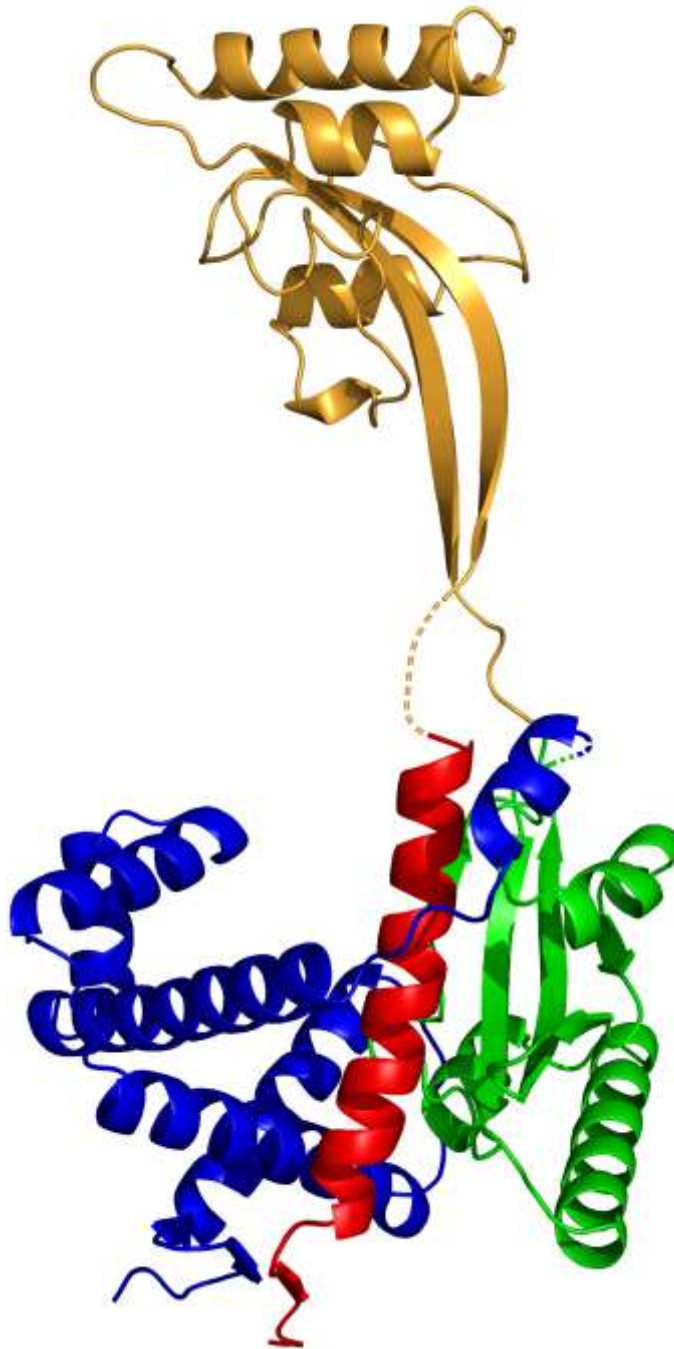


Abb. 3-45: Struktur von SurA. Dreidimensionale Struktur von SurA im Bänderdiagramm. Die Farbkodierung ist analog zum Schema in Abb. 3-43: C-Domäne blau, Parvulin I-Domäne grün, Parvulin II-Domäne ocker und C-Domäne rot. Verbindungen zwischen Domänen, die aufgrund ihrer Flexibilität nicht aufgelöst werden konnten, sind unterbrochen eingezeichnet. Die C-, N- und Parvulin I Domäne bilden gemeinsam die sogenannte „Kerndomäne“ von SurA, welche mit der prolyliso-meraseaktiven Parvulin II-Domäne über zwei flexible Linker verbunden ist. Die Strukturdarstellungen wurden mit dem Programm PyMol (DeLano 2003) unter Verwendung der Strukturdaten der Proteinkette „D“ der PDB-Strukturdatei 1M5Y (Bitto & McKay 2002) erstellt.

Selbst der Ausfall aller vier periplasmatischen PPIasen in *E. coli* kann unter Standardlaborbedingungen verkraftet werden, dürfte aber dennoch weitreichende Folgen für das Überleben in natürlichen Lebensräumen und besonders in pathogenen Nischen haben. So ist beispielsweise die Bildung der Typ1-Pili, die für die Infektionsfähigkeit uropathogener *E. coli*

essentiell sind, bei Fehlen der periplasmatischen PPIasen stark gestört (Justice *et al.* 2005). Außerdem konnten Watts und Hunstad zeigen, dass zwar die Kerndomäne für die meisten Chaperonaufgaben von SurA in uropathogenen *E. coli* ausreicht, dass die Gegenwart der beiden parvulinähnlichen Domänen aber unverzichtbar ist für eine Novobiocinresistenz dieser Bakterien in Zellkultur, dass also bei Fehlen dieser Domänen doch eindeutig Defekte in der äußeren Zellmembran auftreten müssen (Watts & Hunstad 2008).

Wie schon bei fast allen in dieser Arbeit beschriebenen Prolylisomerasen zeigt sich auch bei SurA das Prinzip eines modularen Aufbaus, bei dem die eigentliche Isomerasedomäne über einen flexiblen Linker mit einer oder mehreren Chaperondomänen verbunden ist, wobei die Chaperondomänen die Substrataffinität zu entfalteten Proteinen erhöhen und somit die katalytische Effizienz der Prolylisomerase bei der Proteinfaltung verbessern. Ob die zentrale Aufgabe dieser Enzyme *in vivo* aber nun eher auf Seite der Chaperon- oder der Isomerasefunktion liegt, ist nach wie vor unklar. Es deutet sich jedoch mehr und mehr an, dass eine so strenge Unterscheidung dieser beiden Funktionen eher dem menschlichen Streben nach klarer Kategorisierung entspringt, dass für die Natur aber ohnehin das „Miteinander“ beider Funktionen den größten Nutzen erbringt.

4. Zusammenfassende Diskussion

Mehrere modular aufgebaute Prolylisomerasen wurden im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert. Die erste PPIase, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist und eingehend untersucht wurde, ist der Trigger-Faktor. Er kommt in allen Eubakterien vor und erreicht in Proteinrückfaltungstests deutlich höhere Aktivitätswerte als kleine Eindomänenproteine wie FKBP12. Hauptursache dafür ist eine deutlich höhere Affinität für entfaltete Proteine, die durch Mitwirkung zusätzlicher Bindungsstellen auf den Nachbardomänen bewirkt wird. Offenbar vereint Trigger-Faktor in sich die Funktion eines Faltungshelferenzyms und die eines Chaperons.

4.1. Substratbindungseigenschaften bestimmen die Aktivität des Trigger-Faktors

4.1.1. Die Substratbindung ist dynamisch

Die Lokalisation des Trigger-Faktors am Ribosom und seine kombinierte Chaperon- und Prolylisomeraseaktivität machen ihn auf den ersten Blick zu einem idealen Faltungshelfer. Direkt dort, wo ein neu synthetisiertes Protein ins Cytoplasma eintritt, hat Trigger-Faktor sofort Zugriff auf neue Proteinketten, bevor diese unproduktive Wechselwirkungen wie vorzeitige Faltung oder Aggregation eingehen können. Allerdings benötigen viele Proteine gar keine Hilfe durch Faltungshelfer. Eine lange Bindung an den Trigger-Faktor wäre für solche Proteine also von Nachteil. Auch Proteine, die eine Prolylisomerisierung durchlaufen müssen, sollten nicht statisch gebunden werden, um die Faltung nicht unnötig lange zu verzögern. Einer relativ hohen Substrataffinität für entfaltete Proteinsubstrate steht beim Trigger-Faktor eine niedrige Umsatzrate ($k_{\text{cat}} \approx 1,3 \text{ s}^{-1}$) gegenüber. Es wurde daher unter anderem vermutet, dass eine langsame Substratfreisetzung der Grund hierfür sein könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der Substratbindung und -freisetzung dafür nicht verantwortlich ist. Die Dynamik der Substratbindung des Trigger-Faktors konnte anhand der Fluoreszenzänderung entfalteter Proteine bei Bindung an den Trigger-Faktor beobachtet werden. Von großer Hilfe war in diesem Zusammenhang die tryptophanfreie Variante TF W151F, die Fluoreszenzmessungen auch bei hohen Konzentrationen ermöglichte. Substratbindungsreaktionen finden im mittleren Millisekundenbereich statt, und die Halbwertszeiten sowohl für den freien wie auch für den gebundenen Zustand liegen im Bereich von 100 bis 200 ms. Viele Proteine können sich innerhalb weniger Millisekunden in ihren nativen Zustand falten. Somit würde die Lebensdauer des ungebundenen Zustandes ausreichend Zeit bieten, dass sich solche Proteine oder Proteindomänen durch Faltung einer erneuten Bindung durch den Trigger-Faktor entziehen.

Die Lebensdauer des gebundenen Zustandes entspricht der Dauer der Synthese weniger Peptidbindungen bei der bakteriellen Proteinsynthese. Sie erlaubt, dass Trigger-Faktor durch ständiges Binden und Loslassen eine neu synthetisierte Proteinkette nach Prolinresten abscannt, die eine Isomerisierung benötigen. Die schnelle Abdissoziation erlaubt es Proteindomänen mit korrekten Prolinbindungen, schnell zum nativen Zustand zu falten. Die Dynamik der Substratbindung ist also nicht limitierend für die niedrige Umsatzzahl des Trigger-Faktors. Die aus den Bindungskinetiken ermittelte Dissoziationskonstante für den Komplex aus Trigger-Faktor und entfalteten Substraten bestätigt dagegen näherungsweise die Affinitätswerte, die bisher aus Aktivitäts- und besonders aus Inhibitionsmessungen bekannt waren.

Keine endgültige Aussage lassen die Bindungsstudien zum genauen Mechanismus der Substratbindung zu. Auffällig waren das Auftreten einer zweiten langsameren Phase mit geringer Signalstärke sowie das Erreichen einer maximalen Assoziationsrate ab einer bestimmten Konzentration. Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Das erste Phänomen könnte auf eine Heterogenität eines der eingesetzten Proteine zurückgeführt werden. Später durchgeführte Bindungsstudien von J. Koch mit fluoreszenzmarkiertem Trigger-Faktor deuten ebenfalls auf mindestens zwei verschiedene Bindungsereignisse mit unterschiedlicher Bindungsaffinität hin (Koch 2009). Die zweite Auffälligkeit deutet an, dass es sich bei der Bindung um einen Prozess aus mehreren Schritten handeln könnte: Einer ersten konzentrationsabhängigen Assoziation folgt später ein Umlagerungsschritt, der erst zur beobachteten Signaländerung führt.

Möglicherweise spielt auch das Monomer-Dimer-Gleichgewicht des Trigger-Faktors hier eine Rolle: Da Trigger-Faktor hydrophobe Regionen entfalteter Proteine bindet, wurde vermutet, dass er selbst auch zugängliche hydrophobe Oberflächen besitzt. Dies wurde durch die Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur bestätigt (s. Abb. 4-1 C). Somit sollte Trigger-Faktor auch eine Tendenz zur Selbstassoziation besitzen. In Kooperation mit H. Lilie (Halle/Saale) konnte dies durch Ultrazentrifugationsexperimente nachgewiesen werden. Trigger-Faktor dimerisiert und die Dissoziationskonstante liegt bei ca. 2 μM . Die Annahme, dass nur Monomere an entfaltete Proteinketten oder Ribosomen binden sollten (Kaiser *et al.* 2006), könnte die Abweichungen von Einschritt-Bindungsmodellen bei der Auswertung kinetischer Bindungsdaten in dieser Arbeit erklären. So ist es möglich, dass die schnelle Phase die Assoziation zwischen bereits im Reaktionsansatz vorliegenden Trigger-Faktor-Monomeren und RCM-La darstellt, während die langsame Phase durch Trigger-Faktor-Monomere bewirkt wird, die erst durch Dissoziation von Trigger-Faktor-Dimeren „nachgeliefert“ werden.

Die Dimerform des Trigger-Faktors wurde auch als mögliche Speicherform diskutiert, die die Konzentration bindungsbereiter TF-Monomere in der Zelle herabsetzt, solange diese nicht benötigt werden (Patzelt *et al.* 2002; Kaiser *et al.* 2006).

4.1.2. Bindungsmotive ähneln denen von DnaK

Die Zunahme des Inhibitions potentials von RCM-La nach partieller Proteolyse (Scholz 1999) deutete auf das Vorhandensein mehrerer Trigger-Faktorbindungsstellen innerhalb der Sequenz von α -Lactalbumin hin. Mit Hilfe einer Peptidbibliothek wurden diese Bindungsstellen identifiziert. Es zeigten sich drei dominierende Bindungsbereiche. Die Leserichtung der Sequenz spielte hierbei nur eine geringe Rolle. Zwar ließ die geringe Zahl der hier untersuchten Peptide noch keine allgemeinen Rückschlüsse auf ein Trigger-Faktorbindungsmotiv zu, aber es fiel deutlich die Häufung basischer Reste in den bindenden Peptiden auf. Die Analyse des Sequenzbereichs um Prolin39 (wo im RCM-T1-Rückfaltungstest die Isomerisierung katalysiert werden muss) von RNase T1 erbrachte ein ähnliches Resultat. Jeder beliebige mindestens 5 Aminosäuren lange Ausschnitt aus der RNase T1-Sequenz von Ser37 - Tyr45 wurde von Trigger-Faktor gebunden, solange jeweils das negativ geladene Glu46 nicht Bestandteil des Peptides war. Der Austausch von Pro39 gegen Ala, Gly, Val oder D-Pro störte die Wechselwirkung mit Trigger-Faktor nicht. Die einzige Gemeinsamkeit aller dieser TF-bindenden Peptide der RNase T1-Sequenz war, dass sie mindestens ein Lysin enthielten. Offensichtlich werden also generell Sequenzen mit basischen Resten bevorzugt, während saure Reste für eine Bindung hinderlich sind.

Zwischenzeitlich bestätigte eine Studie der Gruppe von B. Bukau (Heidelberg) mit knapp 3.000 Peptiden die in dieser Arbeit ermittelten Daten. Nach dieser Studie ergibt sich als ideales Bindungsmotiv eine Folge von etwa acht Aminosäuren, in der aromatische und basische Reste wie Trp, Tyr, Phe, His, Arg und Lys bevorzugt sind, und in der saure Reste eher selten vorkommen. Die Gegenwart von Prolinen oder die Reihenfolge der Aminosäuren in diesem Motiv spielt dabei keine Rolle (Patzelt *et al.* 2001). Dabei zeigte sich, dass die Bindungsmotive von Trigger-Faktor und DnaK ähnlich sind (Rüdiger *et al.* 1997; Patzelt *et al.* 2001; Deuerling *et al.* 2003). Dies ist möglicherweise eine Grundlage dafür, dass sich die Chaperone, trotz ihrer unterschiedlichen Lokalisation und Mechanismen, komplementieren können. Möglicherweise hat sich eine derartige Anhäufung hydrophober und positiv geladener Reste als allgemeines Erkennungsmotiv entfalteter Proteinbereiche für verschiedene Chaperone etabliert.

Die Entdeckung, dass die gleichzeitige Inaktivierung der Gene für DnaK und TF unter vielen Bedingungen für *E.coli* letal ist (Deuerling *et al.* 1999), während die Inaktivierung eines einzelnen dieser Gene nur zu geringen Effekten führt, sowie das hier identifizierte ähnliche Bindungsmotiv führten zu Spekulationen, dass beide Proteine gleichartige Chaperonfunktionen ausüben und sich funktionell direkt gegenseitig ersetzen könnten. Dennoch unterscheiden sich Trigger-Faktor und DnaK in ihren Bindungseigenschaften grundlegend. Die Funktion von DnaK ist primär eine haltende mit sehr hoher Affinität zu entfalteten Proteinen. Die Freisetzung des Substrats erfordert Cochaperone sowie Energie in Form von ATP. Bei niedriger Energieladung der Zelle bleiben Proteinsubstrate so lange an DnaK gebunden, bis sich die (Faltungs-)Verhältnisse wieder gebessert haben. Bei Trigger-Faktor ist die Proteinbindung für

eine PPIase relativ stark, angesichts von Dissoziationskonstanten im Bereich von 1 μM jedoch gering im Vergleich zu Chaperonen wie DnaK oder GroEL. Außerdem ist die Bindung sehr dynamisch. Anders als bei DnaK und GroEL haben Nukleotide wie ATP keinen Einfluss auf den Bindungsverlauf. Auch wurden bis heute keine weiteren Cofaktoren identifiziert, welche die Bindungscharakteristika des Trigger-Faktors beeinflussen. In all diesen Bindungseigenschaften ähnelt TF daher viel eher dem Chaperon SecB, das ebenfalls energieunabhängig und schnell zwischen gebundenem und freiem Zustand wechselt (Randall & Hardy 1995; Topping & Randall 1997), als dem Chaperon DnaK.

4.1.3. Dualismus von Isomeraseaktivität und Chaperonaktivität beim Trigger-Faktor

Das parallele Auftreten von chaperontypischen und katalytischen Eigenschaften zeigte sich bei Trigger-Faktor in verschiedenen Experimenten. Eine der wichtigsten Aufgaben von Chaperonen ist es, die Aggregation von nicht korrekt gefalteten Proteinen zu verhindern. Im Citratsynthese Rückfaltungstest nach Buchner *et. al.* (1998) konnte die Aggregation der Citratsynthese durch Trigger-Faktor bis zur Nachweisgrenze unterdrückt werden. Allerdings waren hierfür höhere Konzentrationen an TF nötig als dies für DnaK oder GroEL der Fall ist – ein weiterer Hinweis auf die geringere Substrataffinität und ein anderes Bindungsverhalten des Trigger-Faktors. Die immer wieder stattfindende Freisetzung des Substrats dürfte ein Grund für die schwächere Unterdrückung der Aggregationsneigung sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Trigger-Faktor bevorzugt entfaltete Proteine bindet und aufgrund der thermodynamischen Kopplung der Bindungs- mit der Entfaltungsreaktion in der Lage ist, ein labiles Protein zu entfalten. Hierbei trat deutlich der Dualismus zwischen Isomerase- und Chaperoneigenschaften des Trigger-Faktors zutage: Bei substöchiometrischen (katalytischen) Konzentrationen bewirkte er als Prolylisomerase primär eine Beschleunigung der Entfaltungsreaktion, ohne deren Amplitude deutlich zu beeinflussen. Ab stöchiometrischen Konzentrationen zeigte sich dann die Chaperonfunktion: Durch Bindung des entfalteten Zustandes wurde die Entfaltungsamplitude erhöht und aufgrund weniger freier Substratmoleküle nahm die Geschwindigkeit der (Ent-)Faltungsreaktion nun wieder ab.

Diese Verlangsamung konformationeller Faltungsschritte durch Trigger-Faktor konnte noch deutlicher bei der Rückfaltung von apo-Lactalbumin gezeigt werden. Die Bindung des Trigger-Faktors an entfaltetes Lactalbumin erniedrigte signifikant die Konzentration eines Faltungsintermediats und somit die Geschwindigkeit des gesamten Faltungsverlaufs.

Der Chaperon-/Isomersedualismus zeigte sich erneut bei der Rückfaltung des schnell faltenden Isomers U_F von RCM-T1, diesmal jedoch auf besonders unproduktive Weise: Zwar beschleunigt der Trigger-Faktor die langsame Phase der Rückfaltung durch Katalyse der Isomerisierung der Prolylbindung, allerdings sorgt er durch seine katalytische Wirkung auch erst für eine Population des langsam faltenden U_S -Isomers und somit für die Entstehung dieser langsa-

men Phase. Hier zeigt sich ein enzymatisches Grundprinzip: Enzyme beschleunigen die Einstellung eines Gleichgewichts, nehmen aber keinen Einfluss auf die Lage des Gleichgewichts. Eine Prolylisomerase kann nicht „wissen“, welches Isomer für die Faltung eines Proteins günstig ist. Sie katalysiert die Isomerisierung nur statistisch in beide Richtungen. Bei stöchiometrischen Konzentrationen kommt dann zusätzlich wieder die Chaperonfunktion des Trigger-Faktors zum Tragen. Durch Bindung entfalteter Moleküle an TF wird die Konzentration faltungsfähiger freier U_F-Spezies derart verringert, dass sich die Faltung von RCM-T1 wie die von apo-LA deutlich verlangsamt. Die hohe Bindungsdynamik des Trigger-Faktors gewährleistet jedoch, dass keine völlige Blockade der Faltung eintritt. Mittlerweile wurde der Effekt der Faltungsverzögerung durch Trigger-Faktor auch *in vivo* belegt (Agashe *et al.* 2004; Xie & Zhou 2008).

4.2. Die Ribosomenwechselwirkung des Trigger-Faktors

Die Entwicklung fluoreszenzmarkierter Trigger-Faktorvarianten ermöglichte die Untersuchung der Ribosomenbindung des Trigger-Faktors. Ein hoch konserviertes Bindungsmotiv in der N-terminalen Domäne ist für diese Bindung essentiell. Der Austausch von drei Aminosäuren in diesem Motiv (TF FRK/AAA) verhindert die Bindung ans Ribosom (Kramer *et al.* 2002). Die Variante TF FRK/AAA stellt ein wichtiges Werkzeug bei der Kontrolle von Bindungsexperimenten dar.

Mit BADAN-TF R14C konnten die Bindung ans Ribosom, die Dissoziation und die Verdrängung durch unmarkierten Trigger-Faktor beobachtet werden. Für den *in vivo* relevanten unmarkierten Trigger-Faktor liegt die Dissoziationskonstante für den TF-Ribosomen-Komplex bei ca. 1 μM , also im gleichen Bereich wie die Konstante für den Komplex zwischen TF und entfaltenen Proteinen. Da die zelluläre Konzentration an Ribosomen bei 20 μM und die von TF bei 35-50 μM liegt (Gouy & Grantham 1980; Lill *et al.* 1988; Göthel *et al.* 1998; Teter *et al.* 1999), sollten *in vivo* über 90 % aller Ribosomen mit TF besetzt sein. Nimmt man weiter an, dass sich die Bindungsenergien in den Komplexen zwischen TF und Ribosom und zwischen TF und Proteinkette bei Bildung des ternären Komplexes aus Ribosom, naszierender Kette und Trigger-Faktor annähernd additiv verhalten, so kann man von einer 100-prozentigen Trigger-Faktor-Sättigung translatierender Ribosomen ausgehen.

Die Lebensdauer des Komplexes aus Ribosom und Trigger-Faktor bei 20°C beträgt etwa 30 sec. Auch wenn die Dynamik bei 37°C etwas höher sein dürfte, reicht die Verweildauer des Trigger-Faktors am Ribosom doch für die Synthese vieler Peptidbindungen und sogar mancher vollständiger Proteinketten aus. Dies gewährleistet, dass Trigger-Faktor während der Synthese einer Proteinkette am Ribosom gebunden bleibt, während er die naszierende Kette immer wieder bindet und loslässt. Auf diese Weise wird die naszierende Kette effizient vor unerwünschten Wechselwirkungen mit anderen ungefalteten Proteinketten abgeschirmt. Außerdem wird

eine vorzeitige Faltung unvollständiger Proteindomänen verhindert, und der Trigger-Faktor kann bereits während der Proteinsynthese die wachsende Peptidkette schnell und effizient nach Prolylbindungen absuchen, an denen eine *cis-trans*-Isomerisierung katalysiert werden sollte.

Während der Experimente zu dieser Arbeit war die genaue Trigger-Faktorbindungsstelle auf der großen Untereinheit des Ribosoms noch nicht bekannt. Es wurde lediglich vermutet, dass diese in der Nähe der Austrittsstelle der naszierenden Kette liegen sollte, damit TF besonders effizient mit naszierenden Ketten wechselwirken kann. Diese Vermutung wurde bestätigt, als das ribosomale Protein L23 direkt neben der Proteinaustrittsstelle als Bindungspartner des Trigger-Faktors identifiziert werden konnte (Kramer *et al.* 2002; Blaha *et al.* 2003).

Die Ergebnisse dieser Arbeit waren Grundlage für weitere Forschung anderer Arbeitsgruppen zur Ribosomenbindung des Trigger-Faktors in komplexeren Systemen, beispielsweise mit RNCs (= *ribosome nascent chain complexes*). Diese arretierten Komplexe dienen als Modell für translatierende Ribosomen, wobei sie die enorme Dynamik tatsächlich translatierender Ribosomen freilich nicht widerspiegeln können. Dort fand insbesondere die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte fluoreszierende Variante BADAN-TF R14C Anwendung. Die Gruppe von F.U. Hartl (Martinsried) entwickelte aufgrund von Echtzeitstudien einen kompletten Wirkungszyklus für den Trigger-Faktor einschließlich der meisten Geschwindigkeiten bzw. Halbwertszeiten: Ungebundener TF ist in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht. Die Bindung des Monomers ans Ribosom bewirkt eine strukturelle Öffnung des TF und so eine bessere Substratzugänglichkeit und gleichzeitig eine Stabilisierung der Monomerform. Während der Translation bindet TF verschiedene Segmente der naszierenden Kette. Nach der Translation kann TF am Ribosom verbleiben oder sich mit der neu synthetisierten Kette vom Ribosom lösen und im Cytosol mehrere Substrat-Binde- und Freisetzungszyklen durchlaufen und schließlich wieder seine ungebundene kompakte Struktur einnehmen, die im Monomer-Dimer Gleichgewicht steht (Kaiser *et al.* 2006). Die Gruppe von B. Bukau und E. Deuerling (Heidelberg) untersuchte mit BADAN-TF R14C ebenfalls die Dynamik der TF-Wechselwirkung mit RNCs unter besonderer Berücksichtigung von Länge, Sequenz und Faltungszustand der naszierenden Kette (Rutkowska *et al.* 2008).

4.3. Die Struktur des Trigger-Faktors

Erst nach Beendigung der Forschung zu dieser Arbeit konnte die dreidimensionale Struktur des Trigger-Faktors aufgeklärt werden (Ferbitz *et al.* 2004; Ludlam *et al.* 2004). TF zeigt eine ausgedehnte dreidimensionale Struktur (Abb. 4-1), die von den Autoren mit der Gestalt eines Drachen verglichen wurde. Den „Schwanz“ bildet die N-terminale Ribosomenbindungsdomäne, am entgegengesetzten Ende befindet sich als „Kopf“ die PPIasedomäne. Zwischen beiden liegt die C-terminale Domäne, die den „Rücken“ und die „Arme“ des Drachen bildet. Hierbei ist der Linker zwischen N-terminaler Domäne und PPIasedomäne integraler Bestand-

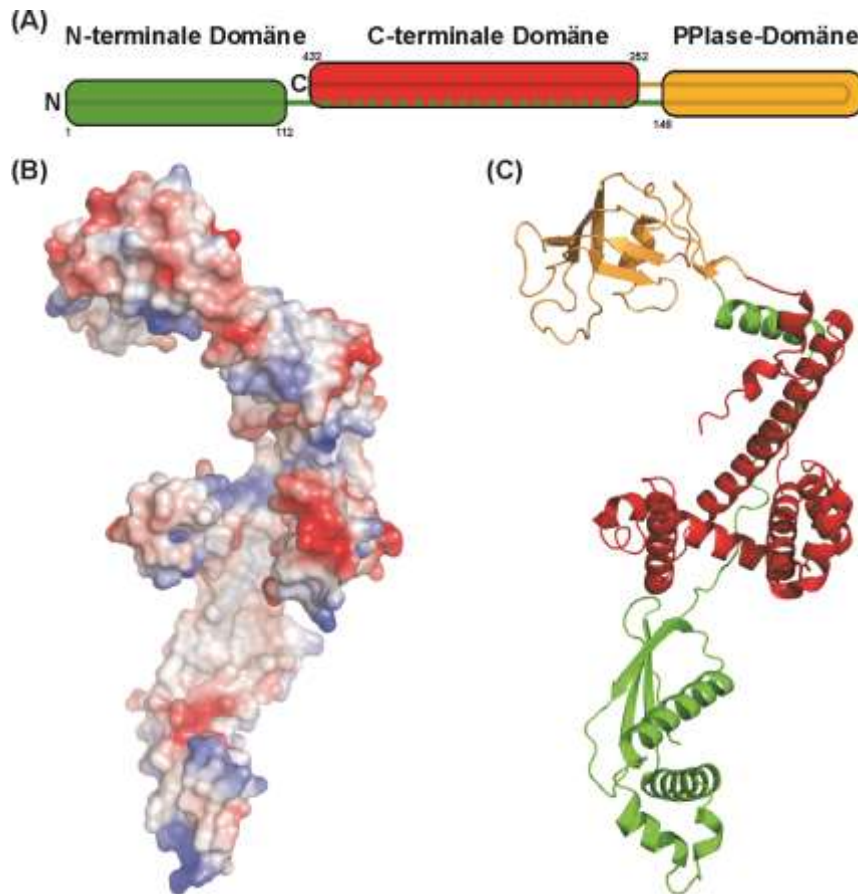


Abb. 4-1: Struktur von Trigger-Faktor. (A) Domänenorganisation der TF-Sequenz mit den Aminosäurepositionen. (B) Elektrostatisches Potential der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche von TF. Positiv geladene Bereiche sind blau, negativ geladene rot gefärbt. Gut zu erkennen ist die langgestreckte schwach geladene hydrophobe Furche. (C) Bänderdiagramm der Struktur von TF mit gleicher Farbcodierung wie in (A). Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol (DeLano 2003) unter Verwendung der PDB-Strukturdaten 1W26 (Ferbitz *et al.* 2004) erstellt.

teil der C-terminalen Domäne. Dies erklärt, warum die Produktion und Charakterisierung der isolierten C-terminalen Domäne bislang gescheitert war (Zarnt *et al.* 1997). Ohne diesen Linkeranteil ist die C-terminale Domäne strukturell nicht intakt und wird vermutlich bei Expression in kurzer Zeit proteolytisch abgebaut. Gemeinsam mit der N-terminalen Domäne bildet die C-terminale Domäne mit ihren Armen einen langgestreckten Hohlraum mit relativ vielen hydrophoben Resten an der Oberfläche (Abb. 4-1 B). Dies stützt die langjährige Vermutung, dass die C-terminale Domäne zur Bindung entfalteter Proteinketten beitragen und so die Substrataffinität des Trigger-Faktors erhöhen könnte.

Gleichzeitig mit der Gesamtstruktur des *E. coli* Trigger-Faktors publizierten Ferbitz *et al.* die Struktur der N-terminalen Domäne des *EcTF*, gebunden an die große Untereinheit des Ribosoms aus dem Archaeon *Haloarcula marismortui*. Ausgehend davon präsentierten sie ein spekulatives Modell für die ribosomengebundene Struktur des gesamten Trigger-Faktors: TF beugt sich mit seiner N- und C-terminalen Domäne über den Ausgang des ribosomalen Tunnels. Zusammen mit den Armen der C-terminalen Domäne ergibt sich so ein Hohlraum, der groß genug wäre für die Aufnahme eines globulären Proteins bis zu 15 kDa. Die Autoren pos-

tulierten daher, dass dieser Bereich des TF der aus dem Ribosom austretenden Kette einen abgeschlossenen Faltungsraum zur Verfügung stellt und dass TF aus dem ternären Komplex dissoziiert, sobald sich eine Domäne in diesem Hohlraum korrekt gefaltet hat. Sobald wieder eine ausreichend lange ungefaltete Sequenz aus dem Ribosom herausragt, sollte TF dann wieder an den RNC binden und den geschützten Faltungsraum bieten (Ferbitz *et al.* 2004).

Diesem Modell aus einem heterologen System widerspricht eine Struktur aus der N-terminalen TF-Domäne und der 50S-Ribosomenuntereinheit, jeweils aus *Deinococcus radiodurans*. Hier ragt eine Schleife des ribosomalen Proteins L24 in den vorher postulierten Faltungsraum und verkleinert das zur Verfügung stehende Volumen drastisch (Schlünzen *et al.* 2005). Zwar kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, welches System die typischen bakteriellen Verhältnisse besser widerspiegelt, jedoch scheint ein homologes bakterielles System verlässlicher als ein heterologes System mit einem Ribosom aus einem Archaeon, insbesondere, da Archaeen selbst keinen Trigger-Faktor besitzen. In diesem bakteriellen System wäre eine komplette Domänenfaltung in einem abgeschirmten Raum nicht möglich. Schlünzen *et al.* (2005) schlagen vor, dass TF durch die zusätzliche Wechselwirkung mit L24 so ausgerichtet wird, dass er in direkter Verlängerung des ribosomalen Tunnels der naszierenden Kette einen hydrophoben Kanal zur Verfügung stellt, durch den die neu synthetisierte Kette über die gesamte Länge des Trigger-Faktors geschleust wird – von der N-terminalen über die C-terminale bis zur PPIase-Domäne. Durch diese Streckung der naszierenden Kette würden verfrühte intramolekulare Wechselwirkungen unterbunden, die zu Fehlfaltungen führen könnten. Erst wenn die gesamte Sequenz für eine Faltungsdomäne aus dem Ribosom ragt, könnte die Kette sich von TF lösen und falten. Unterstützung erhielt dieses Modell durch Quervernetzungsexperimente, die zeigten, dass eine naszierende Kette, abhängig von ihrer Länge, tatsächlich mit allen Regionen dieser langen hydrophoben Furche bis hin zur PPIase-Domäne wechselwirken kann (Lakshmipathy *et al.* 2007).

4.4. SurA ähnelt Trigger-Faktor in vielen Eigenschaften

Ähnlich wie Trigger-Faktor ist die periplasmatische PPIase SurA aus mehreren Domänen aufgebaut. Sequenzalignments ergaben, dass SurA zwei Parvulin-homologe Domänen ParI und ParII sowie eine N- und eine C-terminale Domäne besitzen sollte. Erst die Stukturaufklärung (Bitto & McKay 2002) brachte zutage, dass N- und C-Domäne in Wirklichkeit eine einzige gemeinsame Strukturdomäne bilden. Anders als beim Trigger-Faktor zeigt eine Deletion von SurA *in vivo* starke Effekte (Tormo *et al.* 1990; Lazar & Kolter 1996; Missiakas *et al.* 1996; Rouviere & Gross 1996). Nun wurde untersucht, welche der Domänen von SurA für seine Funktion *in vivo* am bedeutendsten ist und ob insbesondere die Prolylisomerasefunktion dafür notwendig ist.

Die isolierte Domäne ParII ist im Peptidtest genauso aktiv wie das Volllängenprotein, hat im RCM-T1-Test aber nur ca. 1% der Aktivität von komplettem SurA. Die Domäne ParI ist selbst nicht signifikant isomeraseaktiv. In Fusion mit ParII erhöht sie aber deren Faltungshelferaktivität. Vermutlich verbessert sie die Substrataffinität durch eine zusätzliche Proteinbindungsstelle. Die Faltungseinheit aus N- und C-terminaler Sequenz scheint die höchste Bindungsaffinität für entfaltete Proteine zu haben. Dies zeigte sich sowohl in Isomerase- als auch in Chaperontests. Ein ähnliches Bild bot sich bei *in vivo* Tests mit SurA-deletierten Stämmen, die von S. Behrens (San Francisco, USA) durchgeführt wurden: Volllängen-SurA sowie diejenigen Konstrukte, die mindestens die N-terminale und die C-terminale Sequenz trugen, waren in der Lage, den *surA*⁻ Phänotyp zu unterdrücken. Bereits das Minimalkonstrukt SurA-N-Ct reichte dafür aus. Die Gegenwart der isomeraseaktiven Domäne II spielte hingegen ebenso wenig eine Rolle wie die Gegenwart oder Abwesenheit der PPIase-inaktivierenden Mutation. Für die detektierbare *in vivo* Funktion von SurA sind also ausschließlich die chaperonaktiven Bestandteile von SurA verantwortlich (Behrens *et al.* 2001).

Wie beim Trigger-Faktor erhöhen auch bei SurA Domänen mit Chaperonaktivität die Affinität für entfaltete Proteine und somit die Aktivität einer PPIasedomäne im Proteinfaltungstest. Erstaunlicherweise zeigte sich beim Vergleich der beiden Proteinstrukturen von SurA und Trigger-Faktor, dass deren chaperonaktive proteinbindende Domänen strukturell sehr ähnlich sind, ohne dass sie irgendeine Sequenzhomologie aufweisen. Beide bilden jeweils hydrophobe Furchen, von denen zwei Fortsätze wie Arme oder Klammern abstehen. Mittlerweile wurden zahlreiche weitere Proteinstrukturen mit Chaperonfunktion aufgeklärt, die ähnliche klammerförmige Fortsätze zur Proteinbindung benutzen (Stirling *et al.* 2006).

4.5. Zahlreiche weitere PPIasen haben einen modularen Aufbau

Ab Mitte der 1990er Jahre wurden mehrere weitere PPIasen identifiziert, welche einen modularen Aufbau aus mehreren Domänen aufweisen. Einige von diesen wurden ebenfalls in dieser Arbeit charakterisiert. Häufig finden sich dabei wie bei TF und SurA neben der eigentlichen PPIasedomäne Bindungsdomänen mit Chaperonfunktion. Allerdings ist dies nicht immer der Fall.

FKBP22 aus *Neurospora crassa* ist aus zwei Domänen aufgebaut und besitzt im Proteinrückfaltungstest eine etwas höhere Isomeraseaktivität als das Modellprotein für eine isolierte FKBP-Domäne, *hFKBP12*. Diese Aktivität stammt beim *NcFKBP22* aber allein von der Isomerasedomäne. Die Deletion der zweiten Domäne hat keinen Einfluss auf die Aktivität. Später stellte sich heraus, dass die zweite Domäne lediglich als Dimerisierungsmodul dient (Tremmel & Tropschug 2007).

Christian Scholz entdeckte, dass die Fusion einiger modularer PPIasen mit stark aggregationsgefährdeten Virusproteinen (z.B. HIV1 gp41*) deren Löslichkeit dramatisch erhöhen kann.

Wie sich herausstellte, spielt die eigentliche PPIasefunktion für diese technische Anwendung jedoch keine Rolle.

Bei SlyD vermutete man anhand von Sequenzalignments und durch Vergleich mit der bekannten Struktur des *hFKBP12*, dass dieses Protein eine Insertion im schwach strukturierten *flap* der FKBP-Domäne haben sollte. Mit Aufklärung der ersten Strukturen SlyD-verwandter Proteine war klar, dass diese Insertion eine eigene Faltungsdomäne ausbildet, die so genannte IF-Domäne. SlyD* zeigt im RCM-T1-Rückfaltungstest eine deutlich höhere Isomeraseaktivität als *hFKBP12*. Grund dafür ist die IF-Domäne, die Chaperonaktivität besitzt und die Affinität zu entfaltenen Proteinen erhöht. Für die oben beschriebene technische Anwendung genügte es allerdings nicht, SlyD gleichzeitig überzuexprimieren oder der Lösung beizugeben, sondern nur eine kovalente Fusion konnte gp41* in Lösung halten, wobei eine doppelte Fusion (scSlyD*₂) dazu noch besser geeignet war. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die kovalente Fusion im Konstrukt scSlyD*₂ vielleicht auch die PPIaseaktivität von SlyD* im Proteinfaltungstest verbessern könnte. Dies war nicht der Fall. Allerdings handelt es sich bei scSlyD*₂ um ein hocheffizientes Chaperon. Dies erklärt vermutlich, warum in dem Konstrukt SlyD*-SlyD*-gp41* die Aggregation von gp41* so erfolgreich verhindert wird.

FkpA ist eine periplasmatische PPIase, die wie ein „Pfortner“ am Translokon die exportierte Proteinkette in Empfang nimmt. Im RCM-T1-Rückfaltungstest ist FkpA ähnlich aktiv wie Trigger-Faktor oder SurA und ebenfalls durch entfaltetes RCM-La inhibierbar. FkpA ist *in vivo* ein Dimer. Doch wie bei SlyD* bringt eine Fusion zu scFkpA₂ keine Erhöhung der katalytischen PPIaseeffizienz. Auch im Chaperontest zeigt scFkpA₂ nur mäßige Aktivität. Technisch ist FkpA jedoch ein hervorragend geeignetes Helferprotein, um gp41* in Lösung zu halten.

Das FkpA-Dimer hat eine V-förmige Gestalt. Drei Helices der N-terminalen Domäne bilden die Dimerisierungseinheit. Die C-terminalen FKBP-Domänen befinden sich jeweils am Ende der antennenartigen langen Helix 3 und bilden so die äußeren Endpunkte des V (Saul *et al.* 2004). Später konnte nachgewiesen werden, dass je nach Art und Größe eines Proteinsubstrats verschiedene hydrophobe Bereiche sowohl der FKBP-Domänen als auch der Helices 3 der N-Domänen an der Bindung entfalteter Proteine beteiligt sind. Somit tragen also beide Domänen zur Chaperonaktivität von FkpA bei (Hu *et al.* 2006).

Modulare PPIasen kommen auch in thermophilen Bakterien vor. Dies ist erstaunlich, weil bei deren bevorzugten Wachstumstemperaturen auch schon die unkatalysierte Isomerisierungsrate von Prolylbindungen sehr hoch ist. In dieser Arbeit wurden FKBP18 aus *Thermococcus* sp. KS-1 und Trigger-Faktor aus *Thermotoga maritima* untersucht. Durch Einsatz der stabilen Variante RCAM-T1(4X) als Testsubstrat waren neben 15°C auch 25°C und 35°C als Messbedingungen zugänglich. Auch bei 35°C liegt die katalytische Effizienz dieser PPIasen noch deutlich unter derjenigen von *EcTF*. Jedoch zeigt der Anstieg der Aktivität, dass diese bei

noch höheren Temperaturen, die der Messung nicht mehr zugänglich sind, die Aktivität des Trigger-Faktors aus *E. coli* sogar noch übertreffen dürften.

Generell kann man aus den Resultaten dieser Arbeit erkennen, dass besonders effiziente PPIasen modular aus mehreren Domänen aufgebaut sind. Zusätzlich zur eigentlichen katalytischen Domäne finden sich eine oder mehrere Domänen, die zusätzliche Bindungsstellen für entfaltete Proteine zur Verfügung stellen. Durch die kovalente Verknüpfung von PPIase- und Chaperondomäne kann die Faltungshelferfunktion enorm gesteigert werden. Unklar ist bei den verschiedenen Enzymen noch, ob Substrate weiterhin an der Chaperondomäne gebunden bleiben, während Katalyse stattfindet, oder ob die Chaperondomäne zu einer lokalen Substratanreicherung in der Nähe des aktiven Zentrums führt, die Chaperondomäne das Substrat aber generell freigeben muss, bevor die PPIasedomäne katalytisch aktiv werden kann.

Gewöhnlich zeigen isolierte FKBP-Domänen eine hohe Spezifität bezüglich der Aminosäure vor Prolin. Aufgrund der unspezifischen Substratanreicherung nahe des aktiven Zentrums durch die Chaperondomäne wird die Substratspezifität der PPIase in modularen Enzymen jedoch stark herabgesetzt (Jakob *et al.* 2009). Beim modularen Aufbau ist es nicht zwingend nötig, dass die kombinierten Domänen perfekt aufeinander abgestimmt sind. So war eine Chimäre aus dem schwach aktiven humanen FKBP12 und der IF-Domäne aus *EcSlyD* im RCM-T1-Rückfaltungstest stärker aktiv als das natürliche *EcSlyD* (Knappe *et al.* 2007). Sogar Kombinationen aus völlig unverwandten Proteinen konnten hocheffiziente neue Prolylisomerasen erzeugen (Geitner & Schmid 2012; Geitner *et al.* 2013).

4.6. Prolylisomerase oder Chaperon?

Angeichts meist geringer Effekte bei der Deletion von PPIasen stellt sich die Frage nach der Bedeutung dieser Enzyme *in vivo*. Sind diese modularen Proteine in erster Linie PPIasen, die durch eine zusätzliche Chaperonfunktion in ihrer Effizienz verbessert werden, oder handelt es sich hier primär um Chaperone, die als „Dreingabe“ auch noch eine Prolylisomerasefunktion mitbringen, auf die man aber verzichten könnte?

Selbst wenn sich bei Deletion von modularen PPIasen ein Phänotyp einstellt, kann dieser meist durch Expression des entsprechenden Proteins mit inaktivierter bzw. entfernter Enzymfunktion supprimiert werden. Augenscheinlich ist es meist am wichtigsten, dass die Chaperonfunktion intakt ist (Behrens *et al.* 2001; Kramer *et al.* 2004). Dennoch kommen Prolylisomerasen in allen Reichen des Lebens vor. Der Trigger-Faktor kommt in allen Eubakterien vor. Selbst das (bezogen auf die Genomgröße) kleinste freilebende Bakterium, *Mycoplasma genitalium*, verzichtet nicht auf das *tig*-Gen, obwohl doch die Deletion dieses Proteins fast nie zu einem signifikanten Defekt führt.

Einen Hinweis auf die Wichtigkeit von Prolylisomerasen liefern Betrachtungen des Lebens bei niedrigen Temperaturen: Bei 6°C sinkt die Überlebensrate von *E. coli* um 50 %, wenn die Prolylisomerasefunktion von Trigger-Faktor ausgeschaltet wird (Schiene-Fischer *et al.* 2002). Beim Vergleich des Proteoms von *Pseudoalteromonas haloplanktis* bei 20°C und 4°C zeigte sich, dass die Expression des Trigger-Faktors beim Wechsel in die kalte Umgebung um den Faktor 37 hochreguliert wird. Jeder Versuch, eine TF-Deletionsmutante von *Pseudoalteromonas haloplanktis* zu schaffen, schlug bisher fehl - ein Hinweis, dass Trigger-Faktor in diesem kälteliebenden Organismus tatsächlich essentiell sein könnte (Piette *et al.* 2010). Gerade bei niedrigen Temperaturen werden die spontanen Prolylisomerisierungen besonders langsam und hier könnte daher der größte Bedarf an der PPIaseaktivität herrschen.

Die Vermutung, dass Trigger-Faktor angesichts der synthetischen Letalität einer gleichzeitigen Deletion von DnaK und TF die gleichen Chaperonfunktionen übernehmen könne wie DnaK (Deuerling *et al.* 1999), scheint angesichts der deutlich unterschiedlichen Proteinbindungseigenschaften wie Bindungsdynamik, Energiebedarf und Cochaperonabhängigkeit nicht sehr plausibel. Vermutlich stammt die synthetische Letalität von einer indirekten Verbindung. Proteinfaltung erbringt nie 100% Ausbeute. Trigger-Faktor trägt dazu bei, die Faltungsausbeute hoch zu halten, so dass wenig „Ausschuss“ entsteht. Fehlt der Trigger-Faktor, so entsteht bei der Proteinfaltung zwar mehr „Abfall“, aber DnaK trägt dazu bei, dass dieser Abfall rechtzeitig abgebaut wird. Somit ist von außen kein Effekt zu beobachten. Fehlt aber zusätzlich die „Müllabfuhr“ DnaK, so führt das zum Verlust der Wachstumsfähigkeit. TF und DnaK ergänzen sich also eher als dass sie gemeinsame Funktionen teilen.

Die klassische strenge Trennung zwischen Chaperonen und Faltungshelferenzymen scheint angesichts der Vielzahl modularer Faltungshelfer, die beide Funktionen in sich vereinen, nicht mehr zeitgemäß. Die Frage vom Anfang dieses Kapitels stellt sich daher so nicht mehr. Die so genannte „Chaperondomäne“ ist integraler Bestandteil der PPIasefunktion. Durch ihre zusätzlichen Bindungsstellen erhöht sie die Affinität zu entfalteten Proteinsubstraten und macht so erst das Enzym zu einer guten Prolylisomerase. Gleichzeitig macht auch erst die PPIasedomäne das modulare chaperonartige Protein zum effizienten Faltungshelfer.

Das Fehlen messbarer Effekte bei der Deletion von Prolylisomerasefunktionen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Laborbedingungen selten das natürliche Umfeld realistisch abbilden. In der Natur dürften Nahrungsüberangebot und exponentielles Wachstum (wie im Labor) die absolute Ausnahme sein. Üblich sind wohl eher Nahrungsmittelknappheit und Kampf um Überlebensvorteile. Dabei könnte schon eine etwas bessere Energienutzung durch höhere Faltungsausbeuten der entscheidende Faktor sein, welcher entscheidet, ob ein Stamm sich durchsetzt oder unterliegt. Prolylisomerasefunktion und Chaperonfunktion modularer PPIasen helfen gemeinsam, die Faltungsausbeute zu verbessern. Sie ermöglichen so einen effizienteren Energieeinsatz bei der Proteinbiosynthese und schaffen so vielleicht im Ernstfall den entscheidenden Selektionsvorteil.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein tieferer Einblick in die Funktionsweise modular aufgebauter Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen gewonnen werden. Diese bestehen aus mehreren Domänen: Eine enzymatisch aktive Prolylisomerasedomäne wird durch eine oder mehrere zusätzliche Domänen in ihrer Wirkung unterstützt.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf dem Trigger-Faktor aus *E.coli*. Trigger-Faktor ist ein ribosomenassoziiertes Faltungshelfer, der auf einer Proteinkette zwei Funktionen vereint: Chaperonaktivität und Prolylisomeraseaktivität gegenüber naszierenden Proteinketten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass diese Chaperonaktivität stark genug ist, das Ausfallen eines aggregationsanfälligen Proteins völlig zu unterdrücken.

Auf den ersten Blick erscheint die Chaperonbindung einer naszierenden Proteinkette unmittelbar am Ribosom ideal. Jedoch kann diese unspezifische Bindung auch schnelle Faltungsreaktionen behindern. In dieser Arbeit konnte ich nachweisen, dass Trigger-Faktor tatsächlich die *in vitro*-Faltung sowohl eines Proteins mit „nativen“ Prolylisomeren als auch eines Proteins, das bei seiner Faltung gar keine Prolylisomerisierungen durchläuft, verlangsamt. Bei derartigen Rückfaltungsexperimenten treten die Chaperon- und PPIaseaktivitäten in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen zutage: Bei nanomolaren Konzentrationen dominiert die Prolylisomerasefunktion, während im mikromolaren Bereich die Bindungsfunktion und somit der Chaperoncharakter überwiegt.

Die Bindung des Trigger-Faktors an zwei verschiedene entfaltete Proteine, von denen bekannt war, dass sie als kompetitive Inhibitoren wirken, wurde kinetisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die oben beschriebenen, für die Faltung ungünstigen Effekte durch eine schnelle Substratbindung und -freisetzung minimiert werden. Der Komplex zwischen Trigger-Faktor und Substrat ist mit einer Halbwertszeit von nur ca. 120 ms sehr kurzlebig. Die Komplexassoziation verläuft im selben Zeitfenster. Daher können sich schnell faltende Proteine einer unerwünschten Bindung entziehen, während Proteine mit nicht-nativen Prolylisomeren nicht fertig falten und somit erneut zur Katalyse an Trigger-Faktor binden können. Anders als DnaK bindet Trigger-Faktor seine Substrate dynamisch und nukleotidunabhängig. Dies dürfte für eine hohe katalytische Aktivität von Vorteil sein, nicht jedoch für eine möglichst effiziente Chaperonwirkung. Die synthetische Letalität, die auftritt, wenn die Gene für DnaK und Trigger-Faktor gleichzeitig ausgeschaltet werden, dürfte daher eher von einer indirekten Kopplung als von überlappenden Funktionen herrühren. In Abwesenheit von Trigger-Faktor ist die Proteinfaltung verzögert und somit entstehen mehr Proteinaggregate. Fehlt gleichzeitig DnaK, kann diese Aggregatbildung nicht mehr unterdrückt werden und auch die Entsorgung dieser Aggregate findet nicht mehr ausreichend statt. Abgesehen von den Unterschieden bei der Wirkungsweise von Trigger-Faktor und DnaK konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass beide ähnliche Bindungsmotive besitzen: Das typische TF-Bindungsmotiv ist eine Sequenz aus ca. acht Ami-

nosäuren mit bevorzugt basischen und hydrophoben Resten. Es ist vorstellbar, dass sich solch eine Häufung hydrophober und positiv geladener Aminosäuren als generelles Erkennungsmotiv verschiedener Chaperone für entfaltete Proteine entwickelt hat.

Zusätzlich zur Bindungsdynamik zwischen Trigger-Faktor und Proteinsubstraten war die Kinetik der Assoziation mit dem Ribosom für diese Arbeit von besonderem Interesse. Ich habe Trigger-Faktor in seiner ribosomenbindenden N-terminalen Domäne mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und untersucht, wie TF mit dem Ribosom wechselwirkt. Durch Fluoreszenzmessungen konnte ich zeigen, dass Assoziation und Dissoziation des TF-Ribosomenkomplexes verhältnismäßig langsame Prozesse sind. Die durchschnittliche Lebenszeit des Komplexes liegt bei 20°C bei 30 s. Es besteht also ein großer Unterschied in der Dynamik der Wechselwirkungen des Trigger-Faktors mit Ribosomen und mit Proteinsubstraten. Dadurch wird sichergestellt, dass Trigger-Faktor während der gesamten Synthesezeit einer Proteindomäne am Ribosom gebunden bleibt, während er die neu entstehende Kette durch schnelles Binden und Loslassen nach zu isomerisierenden Prolylbindungen absuchen kann.

Sechs weitere modular aufgebaute PPIasen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Für einige von ihnen konnte gezeigt werden, dass sie ideale technische Hilfsmittel für die rekombinante Expression aggregationsempfindlicher Proteine sind. Durch kovalente Fusion an ein instabiles leicht aggregierendes Protein konnte dies für lange Zeit in Lösung gehalten werden. Interessanterweise spielte die Prolylisomeraseaktivität für diese Anwendung keine Rolle. Ich konnte zeigen, dass SlyD, FkpA und SurA aus *E. coli*, FKBP18 aus *Thermococcus* sp. KS-1 und TF aus *Thermotoga maritima* gegenüber faltenden Proteinsubstraten eine deutlich höhere Prolylisomeraseaktivität zeigen als eine isolierte FKBP-Domäne. Nur FKBP22 aus *Neurospora crassa* besitzt eine sehr schwache Aktivität, die durch die zusätzliche Domäne in keiner Weise unterstützt wird.

Bei den beiden PPIasen aus thermophilen Organismen, *Tc*FKBP18 und *Tm*TF, zeigte sich die größere Aktivität erst bei höheren Temperaturen. Es ist bemerkenswert, dass sogar Organismen, die bei 80°C und mehr leben, Prolylisomerasen nutzen, obwohl doch die spontane Isomerisierungsgeschwindigkeit bei diesen Temperaturen hoch genug sein sollte, um eine effiziente Proteinfaltung zu ermöglichen.

All diese hochaktiven Prolylisomerasen verdanken ihre verbesserte Aktivität der Mitwirkung mindestens einer zusätzlichen Domäne. Diese zusätzliche Domäne bietet eine weitere, wenig spezifische Substratbindungsstelle für entfaltete Proteine. Daher zeigen alle dieser stark aktiven modularen Prolylisomerasen auch Chaperonaktivität. Durch Bindung entfalteter Proteine erhöhen die Chaperondomänen in der Umgebung des aktiven Zentrums der Prolylisomerase die Konzentration potentieller Substrate und machen die Isomerase so zu einem hocheffizienten Faltungshelferenzym.

6. Summary

It was the aim of this thesis to gain deeper insight into the function of modular prolyl *cis-trans*-isomerases. These enzymes consist of several domains: an active prolyl isomerase domain that is supported in its action by one or several additional domains.

This work focused in particular on the prolyl isomerase trigger factor of *E. coli*. Trigger factor is a ribosome associated folding helper that harbors two functions in one protein chain: chaperoning of nascent proteins and catalyzing prolyl isomerization in their folding. I could show in this work that trigger factor's chaperone function is strong enough to completely suppress the aggregation of a highly aggregation prone protein.

At first sight, immediate chaperone binding of a newly synthesized protein chain at the ribosome should be ideal. On the other hand, immediate unspecific binding might impede rapid protein folding reactions. In this work, I could show that trigger factor indeed retards the *in vitro* folding of both a protein with native prolyl isomers and a protein that does not involve proline isomerization in its folding pathway. In these refolding experiments, trigger factor exhibited its isomerase and chaperone functions in different concentration ranges. At nanomolar concentrations the catalytic prolyl isomerase function was dominating, whereas in the micromolar range the binding function and thus the chaperone character were prevailing.

I analyzed the kinetics of binding of trigger factor to two different unfolded proteins that were known to be competitive inhibitors of trigger factor action. This analysis revealed that the adverse effects of trigger factor on conformational folding are minimized by rapid binding and release. The complex between trigger factor and a substrate protein is very short-lived with a half-life of only about 120 ms. Association of the complex occurs in the same time range. Fast-folding proteins can thus escape from an accidental interaction with trigger factor, whereas proteins with non-native prolyl isomers cannot fold properly and thus will remain good substrates for repeated rounds of catalysis by trigger factor. Unlike DnaK, trigger factor binds and releases its protein substrates dynamically and independent of nucleotides such as ATP. This should be of advantage for high catalytic activity rather than for efficient chaperoning. Synthetic lethality occurring when genes for trigger factor and DnaK are knocked out simultaneously results probably from an indirect linkage rather than from overlapping functions. In absence of TF, protein folding is retarded and thus more aggregates develop. If DnaK is missing simultaneously, this aggregation can no longer be suppressed, and aggregates are no longer disposed of sufficiently.

Apart from these differences in action of trigger factor and DnaK, I could show in this work that both share similar binding motifs. The typical trigger factor binding motif consists of a stretch of about eight amino acids with a preference for hydrophobic and basic residues. It is

conceivable that such an accumulation of hydrophobic and positively charged amino acids has evolved as a general recognition motif for unfolded proteins in different chaperones.

Additionally to the binding dynamics of trigger factor to substrate proteins, this work focused also on the kinetics of interaction of trigger factor with the ribosome. Trigger factor was labelled in its amino terminal, ribosome binding domain with a fluorescent dye to investigate how it interacts with the ribosome. I found that association and dissociation of the TF-ribosome complex are rather slow reactions. At 20°C the average life time of the complex is around 30 s. Obviously, there are strong differences in the dynamics of the interactions of trigger factor with the ribosome and with protein substrates. This ensures that TF remains bound to the ribosome during the synthesis of a complete protein domain and at the same time is able to scan by rapid binding and release the nascent chain for prolyl bonds to be isomerized.

Six further modular prolyl isomerases were examined in this work. Some of them were shown to be ideal factors for supporting the recombinant expression of aggregation prone proteins. By covalent fusion to the labile protein they were able to maintain it in a soluble form for a long time. Interestingly, prolyl isomerase activity did not play a role for this application. In this work I could show that SlyD, FkpA and SurA from *E. coli*, FKBP18 from *Thermococcus* sp. KS-1 and trigger factor from *Thermotoga maritima* show much higher prolyl isomerase activity towards folding proteins than an isolated FKBP domain would do. Only FKBP22 from *Neurospora crassa* showed weak activity that was not increased by its additional domain. For the two isomerases from thermophiles, TcFKBP18 and TmTF, the high activity only became apparent at elevated temperature. It is remarkable that even organisms living at 80°C and higher make use of prolyl isomerases, although the spontaneous isomerization rate should be high enough at these temperatures to enable efficient protein folding.

All of the highly active prolyl isomerases owe their improved activity to the contribution of at least one additional domain. These domains provide a supplemental, rather unspecific substrate binding site for unfolded proteins. As a consequence, all these highly active modular prolyl isomerases exhibit chaperone function. By binding to unfolded proteins, the chaperone domains increase the concentration of potential substrates close to the active site of the prolyl isomerase and thus transform it into a highly efficient folding helper enzyme.

7. Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

- Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F. X. and Gross, C. A. (2001). "The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions *in vivo* and has chaperone activity." *EMBO J.* **20**: 285-294
- Maier, R., Scholz, C. and Schmid, F. X. (2001). "Dynamic association of Trigger Factor with protein substrates." *J. Mol Biol.* **314**: 1181-1190
- Maier, R., Scholz, C. and Schmid, F. X. (2003). "Interaction of Trigger Factor with the ribosome." *J. Mol Biol.* **326**: 585-592

8. Abkürzungsverzeichnis

[X]	Stoffmengenkonzentration der (ungebundenen) Substanz X
[X] ₀	insgesamt eingesetzte Stoffmengenkonzentration der Substanz X
70S-Ribosom	Ribosom aus großer und kleiner Untereinheit (mit Sedimentationskoeffizient 70 Svedberg)
Acrylodan	6-Acryloyl-2-Dimethylaminonaphthalin
Amp	Ampicillin
apo-LA	apo-Lactalbumin; calciumionenfreies α -Lactalbumin aus Rind
AS	Aminosäure
A _{λ}	Absorption bei Wellenlänge λ
BADAN	5-Bromoacetyl-2-Dimethylaminonaphthalin
BADAN-TF	durch BADAN fluoreszenzmarkierter TF
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CD	Circulardichroismus
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
Cm	Chloramphenicol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-Triphosphat
<i>DpnI</i>	Restriktionsendonuklease I aus <i>Diplococcus pneumoniae</i>
DTE	Dithioerythrol
DTT	1,4-Dithiothreitol
dYT	<i>double Yeast-Tryptone</i> Medium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcFkpA</i>	FKBP-type PPIase A aus <i>E. coli</i>
<i>EcSlyD</i>	<i>sensitivity to lysis D</i> , PPIase aus <i>E. coli</i>
FKBP	FK506-Bindeprotein
FkpA	FKBP-type PPIase A aus <i>E. coli</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GdmCl	Guanidiniumchlorid; Guanidinhydrochlorid
Gp41	Glycoprotein 41 (Hüllprotein des <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
GroEL	60 kDa Chaperonin aus <i>E. coli</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinoethansulfonsäure
hFKBP12	humanes, 12 kDa großes FK506 Bindeprotein
His ₆ -TF	Trigger-Faktor mit Hexahistidin-Tag zur Reinigung an Ni-NTA Matrices
Hsp	Hitzeschockprotein
IAEDANS	(5-(((2-Iodacetyl)amino)ethyl)amino)-naphthalin-1-sulfonsäure)
IF	<i>insertion in flap</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k_{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion
k_{cat}	Geschwindigkeitskonstante einer enzymatisch katalysierten Reaktion
k_{cat}/K_m	katalytische Effizienz eines Enzyms
K_A	Assoziationskonstante; Reziproke der Dissoziationskonstante K_D
K_D	Dissoziationskonstante
k_i	mikroskopische Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion
K_{iso}	Gleichgewichtskonstante einer <i>cis-trans</i> Isomerisierung
Km	Kanamycin

K_M	Michaeliskonstante
K_{NU}	Gleichgewichtskonstante der Entfaltung
k_{off}	mikroskopische Rate der Dissoziation
k_{on}	mikroskopische Rate der Assoziation
k_{uncat}	Geschwindigkeitskonstante einer unkatalysierten (spontanen) Reaktion
LA	s. RCM-La
LA·TF	Komplex aus RCM-La und Trigger-Faktor
MBP	Maltosebindeprotein
mgTF	Trigger-Faktor aus <i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>M. genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>M. pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
mFKBP17	17 kDa großes FK506 Bindeprotein aus <i>Methanococcus thermolithotrophicus</i>
n	Brechungsindex
N	nativer Zustand eines Proteins
N*	nativähnlich gefaltete RCM-T1
NcFKBP22	FK506-Bindeprotein aus <i>Neurospora crassa</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OMP	<i>outer membrane protein</i> , Protein in der äußeren Zellmembran
Par I	parvulinähnliche Domäne 1 aus SurA
Par II	parvulinähnliche Domäne 2 aus SurA
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH ^{X°C}	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration bei X°C
Pin1	peptidylprolyl cis-trans-isomerase NIMA-interacting 1
pNA	para-Nitroanilin bzw. para-Nitroanilid
PPI	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase aus Schweinenierenextrakt
PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (generell)
Prolylisomerase	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCAM-T1(4X)	reduzierte und carbamidomethylierte RNase T1 mit den Mutationen S17A, D29N, Y42F, S54G, P55N
RCM-La	reduziertes und carboxymethyliertes α -Lactalbumin aus Rind
RCM-P39A-T1	reduzierte und carboxymethylierte RNase T1 mit der Mutation P39A
RCM-T1	reduzierte und carboxymethylierte RNase T1 mit den Mutationen S54G, P55N
RNase T1	Ribonuklease T1 aus <i>Aspergillus oryzae</i>
RNase T1(4X)	RNase T1 mit den Mutationen S17A, D29N, Y42F, S54G, P55N
RNC	<i>ribosome-nascent chain complex</i> ; Komplex aus Ribosom und naszierender Proteinkette
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sc	<i>single chain</i> (Praefix für Proteinkonstrukte, bei denen mehrere Module auf einer Proteinkette verbunden wurden)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SlyD	<i>sensitivity to lysis D</i> , PPIase aus <i>E. coli</i>
SlyD*	verkürzte Variante von SlyD (Aminosäuren 1-165)
Suc	Succinyl
SurA	<i>survival protein A</i> , periplasmatische PPIase aus <i>E. coli</i>
SurA-2A	SurA mit den Mutationen H376A, I378A
SurA-I	verkürzte Variante von SurA (nur Domäne Par I)

SurA-II	verkürzte Variante von SurA (nur Domäne Par II)
SurA-I-II	verkürzte Variante von SurA (nur Domänen Par I und Par II)
SurA-I-II-2A	SurA-I-II mit den Mutation H376A, I378A
SurA-N-Ct	verkürzte Variante von SurA (es fehlen die Domänen Par I und Par II)
SurA-N-I-Ct	verkürzte Variante von SurA (es fehlt die Domäne Par II)
SurA-N-II-Ct	verkürzte Variante von SurA (es fehlt die Domäne Par I)
τ	Zeitkonstante (Kehrwert einer Geschwindigkeitskonstante)
TcFKBP18	FK506-Bindeprotein aus <i>Thermococcus</i> sp. KS-1
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TF	Trigger-Faktor
TF FRK/AAA	Trigger-Faktorvariante mit Dreifachmutation F44A/R45A/K46A
<i>tig</i>	Gen für Trigger-Faktor
<i>tmTF</i>	TF aus <i>Thermotoga maritima</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	entfalteter Zustand eines Proteins
U ^{39c}	entfaltete RCM-T1 mit Prolyl-Peptidbindung zwischen Tyr38 und Pro39 in <i>cis</i> -Konformation
U ^{39t}	entfaltete RCM-T1 mit Prolyl-Peptidbindung zwischen Tyr38 und Pro39 in <i>trans</i> -Konformation
U _F	schnell rückfaltendes Isomer eines entfalteten Proteins (hier meist U ^{39c})
U _S	langsam rückfaltendes Isomer eines entfalteten Proteins (hier meist U ^{39t})
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp; Protein mit unveränderter (natürlicher) Aminosäuresequenz
Xaa	beliebige Aminosäure
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
ϵ_{λ}	molarer Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge λ

Aminosäuren und Aminosäureaustausche wurden mit dem üblichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt

9. Literaturverzeichnis

- Agashe, V. R., Guha, S., Chang, H. C., Genevau, P., Hayer-Hartl, M., Stemp, M., Georgopoulos, C., Hartl, F. U. and Barral, J. M. (2004). "Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: increase in yield at the expense of folding speed." *Cell* **117**(2): 199-209.
- Akiyama, H., Shin, R. W., Uchida, C., Kitamoto, T. and Uchida, T. (2005). "Pin1 promotes production of Alzheimer's amyloid beta from beta-cleaved amyloid precursor protein." *Biochem Biophys Res Commun* **336**(2): 521-9.
- Alcock, F. H., Grossmann, J. G., Gentle, I. E., Likic, V. A., Lithgow, T. and Tokatlidis, K. (2008). "Conserved substrate binding by chaperones in the bacterial periplasm and the mitochondrial intermembrane space." *Biochem J* **409**(2): 377-87.
- Allen, R. C., Saravis, C. A. and Maurer, H. R. (1984). Gel electrophoresis and isoelectric focusing of proteins, de Gruyter Berlin.
- Andreotti, A. H. (2003). "Native state proline isomerization: An intrinsic molecular switch." *Biochemistry* **42**(32): 9515-9524.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." *Science* **181**(4096): 223-30.
- Arai, M. and Kuwajima, K. (1996). "Rapid formation of a molten globule intermediate in refolding of alpha-lactalbumin." *Fold.Des.* **1**(4): 275-287.
- Arie, J. P., Sassoon, N. and Betton, J. M. (2001). "Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of Escherichia coli." *Mol Microbiol* **39**(1): 199-210.
- Bagshaw, C. R., Eccleston, J. F., Eckstein, F., Goody, R. S., Gutfreund, H. and Trentham, D. R. (1974). "The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two- step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation." *Biochem J* **141**(2): 351-64.
- Baldwin, R. L. (1996). "On-pathway versus off-pathway folding intermediates." *Folding & Design* **1**: R1-R8.
- Bang, N., Pecht, A., Raddatz, G., Scior, T., Solbach, W., Brune, K. and Pahl, A. (2000). "Prolyl isomerases in a minimal cell - Catalysis of protein folding by trigger factor from Mycoplasma genitalium." *European Journal of Biochemistry* **267**(11): 3270-3280.
- Baram, D., Pyetan, E., Sittner, A., Auerbach-Nevo, T., Bashan, A. and Yonath, A. (2005). "Structure of trigger factor binding domain in biologically homologous complex with eubacterial ribosome reveals its chaperone action." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34): 12017-22.
- Beckmann, R. P., Mizzen, L. E. and Welch, W. J. (1990). "Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly." *Science* **248**(4957): 850-4.
- Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F. X. and Gross, C. A. (2001). "The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions *in vivo* and has chaperone activity." *EMBO J.* **20**: 285-294.
- Bierer, B. E., Mattila, P. S., Standaert, R. F., Herzenberg, L. A., Burakoff, S. J., Crabtree, G. and Schreiber, S. L. (1990). "Two Distinct Signal Transmission Pathways in Lymphocytes-T Are Inhibited by Complexes Formed Between an Immunophilin and Either FK506 or Rapamycin." *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**(23): 9231-9235.
- Bitto, E. and McKay, D. B. (2002). "Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins." *Structure* **10**(11): 1489-98.
- Blaha, G., Wilson, D. N., Stoller, G., Fischer, G., Willumeit, R. and Nierhaus, K. H. (2003). "Localization of the trigger factor binding site on the ribosomal 50S subunit." *J Mol Biol* **326**(3): 887-97.
- Bothmann, H. and Plückthun, A. (2000). "The periplasmic Escherichia coli peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA - I. Increased functional expression of antibody fragments with and without cis-prolines." *Journal of Biological Chemistry* **275**(22): 17100-17105.
- Brandts, J. F., Halvorson, H. R. and Brennan, M. (1975). "Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues." *Biochemistry* **14**: 4953-4963.
- Bruel, N., Castanie-Cornet, M. P., Cirinesi, A. M., Koningstein, G., Georgopoulos, C., Luijck, J. and Genevau, P. (2012). "Hsp33 controls elongation factor-Tu stability and allows Escherichia coli growth in the absence of the major DnaK and trigger factor chaperones." *J Biol Chem* **287**(53): 44435-46.
- Buchberger, A., Schröder, H., Hestekamp, T., Schönfeld, H. J. and Bukau, B. (1996). "Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding." *Journal of Molecular Biology* **261**(3): 328-333.
- Buchner, J. (1996). "Supervising the fold: Functional principles of molecular chaperones." *FASEB J.* **10**(1): 10-19.

- Buchner, J., Grallert, H. and Jakob, U. (1998). "Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein." *Methods Enzymol* **290**: 323-38.
- Bulleid, N. J. and Freedman, R. B. (1988). "Defective co-translational formation of disulphide bonds in protein disulphide-isomerase-deficient microsomes." *Nature* **335**: 649-651.
- Callebaut, I. and Mornon, J. P. (1995). "Trigger factor, one of the Escherichia coli chaperone proteins, is an original member of the FKBP family." *FEBS Lett* **374**(2): 211-5.
- Chazin, W. J., Kördel, J., Drakenberg, T., Thulin, E., Brodin, P., Grundström, T. and Forsén, S. (1989). "Proline isomerism leads to multiple folded conformations of calbindin D9k: direct evidence from two-dimensional NMR spectroscopy." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2195-2198.
- Cheng, H. N. and Bovey, F. A. (1977). "Cis-trans equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycyl-L-proline." *Biopolymers* **16**: 1465-1472.
- Cheng, M.-Y., Hartl, F.-U., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E. M., Hallberg, R. L. and Horwich, A. L. (1989). "Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria." *Nature* **337**: 620-625.
- Cook, K. H., Schmid, F. X. and Baldwin, R. L. (1979). "Role of proline isomerization in folding of ribonuclease A at low temperatures." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 6157-6161.
- Creighton, T. E. (1990). "Protein folding." *Biochemical Journal* **270**: 1-16.
- Crooke, E., Guthrie, B., Lecker, S., Lill, R. and Wickner, W. (1988). "ProOmpA is stabilized for membrane translocation by either purified E. coli trigger factor or canine signal recognition particle." *Cell*(54): 1003-1011.
- Crooke, E. and Wickner, W. (1987). "Trigger factor: a soluble protein that folds pro-OmpA into a membrane-assembly-competent form." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5216-5220.
- Danese, P. N., Snyder, W. B., Cosma, C. L., Davis, L. J. and Silhavy, T. J. (1995). "The Cpx two-component signal transduction pathway of Escherichia coli regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP." *Genes Dev* **9**(4): 387-98.
- DeLano, W. L. (2003). The PyMOL molecular graphics system. *DeLano Scientific LLC*. San Carlos, CA, USA, DeLano Scientific.
- Deuerling, E., Patzelt, H., Vorderwülbecke, S., Rauch, T., Kramer, G., Schaffitzel, E., Mogk, A., Schulze-Specking, A., Langen, H. and Bukau, B. (2003). "Trigger Factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities." *Mol Microbiol* **47**(5): 1317-28.
- Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A. and Bukau, B. (1999). "Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins." *Nature* **400**(6745): 693-6.
- Eckert, B. (2007). Dissertation: Die Bedeutung der Stabilität und des Faltungsmechanismus des Gen-3-Proteins filamentöser Phagen für die Infektion von *Escherichia coli*. *Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften*, Universität Bayreuth.
- Ellis, R. J. and Hartl, F. U. (1996). "Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function." *Faseb J* **10**(1): 20-6.
- Ellis, R. J. and van der Vies, S. M. (1991). "Molecular chaperones." *Annu Rev Biochem* **60**: 321-47.
- Epstein, C. J., Goldberger, R. F. and Anfinsen, C. B. (1963). "The genetic control of tertiary protein structure: studies with model systems." *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **28**: 439-449.
- Evans, P. A., Dobson, C. M., Kautz, R. A., Hatfull, G. and Fox, R. O. (1987). "Proline isomerism in staphylococcal nuclease characterized by NMR and site-directed mutagenesis." *Nature* **329**(6136): 266-8.
- Ferbitz, L., Maier, T., Patzelt, H., Bukau, B., Deuerling, E. and Ban, N. (2004). "Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins." *Nature* **431**(7008): 590-6.
- Fischer, G. (1994). "Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and their effectors." *Angewandte Chemie. International Ed. In English* **33**(14): 1415-1436.
- Fischer, G., Bang, H., Ludwig, B., Mann, K. and Hacker, J. (1992). "Mip Protein of Legionella-Pneumophila Exhibits Peptidyl- Prolyl- cis/ trans Isomerase (PPlase) Activity." *Mol.Microbiol.* **6**(10): 1375-1383.
- Fischer, G., Bang, H. and Mech, C. (1984). "Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden." *Biomed.Biochim.Acta* **43**: 1101-1111.
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, F. X. (1989). "Cyclophilin and peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerase are probably identical proteins." *Nature* **337**: 476-478.
- Freedman, R. B., Hirst, T. R. and Tuite, M. F. (1994). "Protein disulphide isomerase: Building bridges in protein folding." *Trends.Biochem.Sci.* **19**(8): 331-336.
- Geitner, A. J. and Schmid, F. X. (2012). "Combination of the human prolyl isomerase FKBP12 with unrelated chaperone domains leads to chimeric folding enzymes with high activity." *J Mol Biol* **420**(4-5): 335-49.

- Geitner, A. J., Varga, E., Wehmer, M. and Schmid, F. X. (2013). "Generation of a highly active folding enzyme by combining a parvulin-type prolyl isomerase from SurA with an unrelated chaperone domain." *J Mol Biol* **425**(22): 4089-98.
- Genevaux, P., Georgopoulos, C. and Kelley, W. L. (2007). "The Hsp70 chaperone machines of Escherichia coli: a paradigm for the repartition of chaperone functions." *Mol Microbiol* **66**(4): 840-57.
- Gill, S. C. and von Hippel, P. H. (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." *Analytical Biochemistry* **182**: 319-326.
- Giuseppe, P. O., Atzingen, M. V., Nascimento, A. L., Zanchin, N. I. and Guimaraes, B. G. (2011). "The crystal structure of the leptospiral hypothetical protein LIC12922 reveals homology with the periplasmic chaperone SurA." *J Struct Biol*.
- Gnann, J. W., Jr., McCormick, J. B., Mitchell, S., Nelson, J. A. and Oldstone, M. B. (1987). "Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections." *Science* **237**(4820): 1346-9.
- Goldberg, M. E. (1985). "The second translation of the genetic message: protein folding and assembly." *Trends in Biochemical Sciences* **10**: 388-391.
- Goldberger, R. F., Epstein, C. J. and Anfinsen, C. B. (1963). "Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rate liver." *J.Biol.Chem.* **238**: 628-635.
- Goloubinoff, P., Christeller, J. T., Gatenby, A. A. and Lorimer, G. L. (1989). "Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP." *Nature* **342**: 884-889.
- Göthel, S. F., Scholz, C., Schmid, F. X. and Marahiel, M. A. (1998). "Cyclophilin and trigger factor from *Bacillus subtilis* catalyze in vitro protein folding and are necessary for viability under starvation conditions." *Biochemistry* **37**(38): 13392-13399.
- Goto, Y. and Hamaguchi, K. (1982). "Unfolding and refolding of the constant fragment of the immunoglobulin light chain." *J. Mol. Biol.* **156**: 891-910.
- Gouy, M. and Grantham, R. (1980). "Polypeptide elongation and tRNA cycling in Escherichia coli: a dynamic approach." *FEBS Lett* **115**(2): 151-155.
- Grathwohl, C. and Wüthrich, K. (1981). "NMR studies of the rates of proline cis-trans isomerization in oligopeptides." *Biopolymers* **20**: 2623-2633.
- Haber, E. and Anfinsen, C. B. (1961). "Regeneration of enzyme activity by air oxidation of reduced subtilisin-modified ribonuclease." *J Biol Chem* **236**: 422-4.
- Haber, E. and Anfinsen, C. B. (1962). "Side-chain interactions governing the pairing of half-cystine residues in ribonuclease." *J Biol Chem* **237**: 1839-44.
- Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J. and Drugge, R. J. (1984). "Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A." *Science* **226**: 544-547.
- Hani, J., Stumpf, G. and Domdey, H. (1995). "PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases." *FEBS Lett.* **365**(2-3): 198-202.
- Harding, M. W., Galat, A., Ueling, D. E. and Schreiber, S. L. (1989). "A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase." *Nature* **341**: 758-760.
- Harrison, R. K. and Stein, R. L. (1990). "Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes." *Biochemistry* **29**(16): 3813-6.
- Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." *Nature* **381**(6583): 571-580.
- Heinemann, U. and Saenger, W. (1982). "Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex: an x-ray structure." *Nature* **299**: 27-31.
- Hesterkamp, T. and Bukau, B. (1996). "Identification of the prolyl isomerase domain of Escherichia coli trigger factor." *FEBS Lett.* **385**(1-2): 67-71.
- Hesterkamp, T., Deuerling, E. and Bukau, B. (1997). "The aminoterminal 118 amino acids of E. coli trigger factor constitute a domain that is necessary and sufficient for binding to ribosomes." *J. Biol. Chem.* **272**: 21865-21871.
- Hesterkamp, T., Hauser, S., Lütcke, H. and Bukau, B. (1996). "Escherichia coli trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains." *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**(9): 4437-4441.
- Hoaki, T., Nishijima, M., Kato, M., Adachi, K., Mizobuchi, S., Hanzawa, N. and Maruyama, T. (1994). "Growth requirements of hyperthermophilic sulfur-dependent heterotrophic archaea isolated from a shallow submarine geothermal system with reference to their essential amino acids." *Appl Environ Microbiol* **60**(8): 2898-904.
- Hoffmann, E. and Rüterjans, H. (1988). "Two-dimensional ¹H-NMR investigation of ribonuclease T1. Resonance assignments, secondary and low-resolution tertiary structures of ribonuclease T1." *Eur J Biochem* **177**(3): 539-60.

- Höll-Neugebauer, B., Rudolph, R., Schmidt, M. and Buchner, J. (1991). "Reconstitution of a Heat Shock Effect Invitro - Influence of GroE on the Thermal Aggregation of alpha-Glucosidase from Yeast." *Biochemistry* **30**(50): 11609-11614.
- Horne, S. M. and Young, K. D. (1995). "Escherichia coli and other species of the Enterobacteriaceae encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins." *Arch Microbiol* **163**(5): 357-65.
- Horwich, A. L., Fenton, W. A., Chapman, E. and Farr, G. W. (2007). "Two families of chaperonin: physiology and mechanism." *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 115-45.
- Hottenrott, S., Schumann, T., Plückthun, A., Fischer, G. and Rahfeld, J. U. (1997). "The Escherichia coli SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase." *Journal of Biological Chemistry* **272**(25): 15697-15701.
- Hu, K., Galius, V. and Pervushin, K. (2006). "Structural plasticity of peptidyl-prolyl isomerase sFkpA is a key to its chaperone function as revealed by solution NMR." *Biochemistry* **45**(39): 11983-91.
- Huang, G. C., Chen, J. J., Liu, C. P. and Zhou, J. M. (2002). "Chaperone and antichaperone activities of trigger factor." *Eur J Biochem* **269**(18): 4516-23.
- Huang, G. C., Li, Z. Y., Zhou, J. M. and Fischer, G. (2000). "Assisted folding of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by trigger factor." *Protein Science* **9**(6): 1254-1261.
- Huber, R., Langworthy, T. A., König, H., Thomm, M., Woese, C. R., Sleytr, U. B. and Stetter, K. O. (1986). "Thermotoga maritima sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C." *Arch. Microbiol.* **144**: 324-333.
- Ideno, A., Furutani, M., Iwabuchi, T., Iida, T., Iba, Y., Kurosawa, Y., Sakuraba, H., Ohshima, T., Kawarabayashi, Y. and Maruyama, T. (2004). "Expression of foreign proteins in Escherichia coli by fusing with an archaeal FK506 binding protein." *Appl Microbiol Biotechnol* **64**(1): 99-105.
- Ideno, A., Yoshida, T., Iida, T., Furutani, M. and Maruyama, T. (2001). "FK506-binding protein of the hyperthermophilic archaeum, Thermococcus sp. KS-1, a cold-shock-inducible peptidyl-prolyl cis-trans isomerase with activities to trap and refold denatured proteins." *Biochem J* **357**(Pt 2): 465-71.
- Iida, T., Furutani, M., Nishida, F. and Maruyama, T. (1998). "FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from a sulfur-dependent hyperthermophilic archaeon, Thermococcus sp. KS-1." *Gene* **222**(2): 249-55.
- Jabs, A., Weiss, M. S. and Hilgenfeld, R. (1999). "Non-proline cis peptide bonds in proteins." *Journal of Molecular Biology* **286**(1): 291-304.
- Jackson, S. E. and Fersht, A. R. (1991). "Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition." *Biochemistry* **30**: 10428-10435.
- Jaenicke, R. (1987). "Folding and association of proteins." *Prog. Biophys. molec. Biol.* **49**: 117-237.
- Jaenicke, R. (1996). "How do proteins acquire their three-dimensional structure and stability?" *Naturwissenschaften* **83**(12): 544-54.
- Jakob, R. and Schmid, F. X. (2008). "Energetic coupling between native-state prolyl isomerization and conformational protein folding." *J. Mol. Biol.* **in press**.
- Jakob, R. P., Zoldak, G., Aumüller, T. and Schmid, F. X. (2009). "Chaperone domains convert prolyl isomerases into generic catalysts of protein folding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(48): 20282-7.
- John, J., Sohmen, R., Feuerstein, J., Linke, R., Wittinghofer, A. and Goody, R. S. (1990). "Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21." *Biochemistry* **29**(25): 6058-65.
- Justice, S. S., Hunstad, D. A., Harper, J. R., Duguay, A. R., Pinkner, J. S., Bann, J., Frieden, C., Silhavy, T. J. and Hultgren, S. J. (2005). "Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in Escherichia coli." *J Bacteriol* **187**(22): 7680-6.
- Kaiser, C. M., Chang, H. C., Agashe, V. R., Lakshmipathy, S. K., Etchells, S. A., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U. and Barral, J. M. (2006). "Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes." *Nature* **444**(7118): 455-60.
- Kandror, O., Busconi, L., Sherman, M. and Goldberg, A. L. (1994). "Rapid degradation of an abnormal protein in Escherichia coli involves the chaperones GroEL and GroES." *J.Biol.Chem.* **269**(38): 23575-23582.
- Kandror, O. and Goldberg, A. L. (1997). "Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of Escherichia coli at low temperatures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 4978-81.
- Kelley, R. F. and Richards, F. M. (1987). "Replacement of proline-76 with alanine eliminates the slowest kinetic phase in thioredoxin folding." *Biochemistry* **26**: 6765-6774.
- Kelley, R. F. and Stellwagen, E. (1984). "Conformational transitions of thioredoxin in guanidine hydrochloride." *Biochemistry* **23**: 5095-5102.
- Kiefhaber, T., Grunert, H. P., Hahn, U. and Schmid, F. X. (1990a). "Replacement of a cis proline simplifies the mechanism of ribonuclease T1 folding." *Biochemistry* **29**: 6475-6480.
- Kiefhaber, T., Grunert, H. P., Hahn, U. and Schmid, F. X. (1992). "Folding of RNase T1 is decelerated by a specific tertiary contact in a folding intermediate." *Proteins: Structure Function and Genetics* **12**: 171-179.

- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. and Schmid, F. X. (1990b). "Folding of Ribonuclease T₁. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization." *Biochemistry* **29**: 3053-3061.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. and Schmid, F. X. (1990c). "Folding of ribonuclease T₁. 2. Kinetic models for the folding and unfolding reactions." *Biochemistry* **29**: 3061-3070.
- Kim, P. S. and Baldwin, R. L. (1982). "Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding." *Annual Review of Biochemistry* **51**: 459-489.
- Kim, P. S. and Baldwin, R. L. (1990). "Intermediates in the folding reactions of small proteins." *Annual Review of Biochemistry* **59**: 631-660.
- Kleerebezem, M., Heutink, M. and Tommassen, J. (1995). "Characterization of an Escherichia coli rotA mutant, affected in periplasmic peptidyl-prolyl cis/trans isomerase." *Mol. Microbiol.* **18**(2): 313-320.
- Knappe, T. A., Eckert, B., Schaarschmidt, P., Scholz, C. and Schmid, F. X. (2007). "Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding." *J Mol Biol* **368**(5): 1458-68.
- Kobe, B., Center, R. J., Kemp, B. E. and Pombourios, P. (1999). "Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(8): 4319-24.
- Koch, J. (2009). Diplomarbeit: Die Interaktion von permanent entfaltenen Substratproteinen mit der Chaperondomäne von Triggerfaktor. *Laboratorium für Biochemie*, Universität Bayreuth.
- Kofron, J. L., Kuzmic, P., Kishore, V., Colonbonilla, E. and Rich, D. H. (1991). "Determination of Kinetic Constants for Peptidyl Prolyl Cis- Trans Isomerases by an Improved Spectrophotometric Assay." *Biochemistry* **30**(25): 6127-6134.
- Koradi, R., Billeter, M. and Wüthrich, K. (1996). "MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures." *J. Mol. Graph.* **14**(1): 51-55.
- Kramer, G., Patzelt, H., Rauch, T., Kurz, T. A., Vorderwülbecke, S., Bukau, B. and Deuerling, E. (2004). "Trigger factor peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity is not essential for the folding of cytosolic proteins in Escherichia coli." *J Biol Chem* **279**(14): 14165-70.
- Kramer, G., Rauch, T., Rist, W., Vorderwülbecke, S., Patzelt, H., Schulze-Specking, A., Ban, N., Deuerling, E. and Bukau, B. (2002). "L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome." *Nature* **419**(6903): 171-174.
- Kuwajima, K. (1989). "The molten globule as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure." *Proteins, Struct.Funct.Genet.* **6**: 87-103.
- Kuwajima, K. (1996). "The molten globule state of alpha-lactalbumin." *FASEB J.* **10**(1): 102-109.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lakshmipathy, S. K., Tomic, S., Kaiser, C. M., Chang, H. C., Genevau, P., Georgopoulos, C., Barral, J. M., Johnson, A. E., Hartl, F. U. and Etchells, S. A. (2007). "Identification of nascent chain interaction sites on trigger factor." *J Biol Chem* **282**(16): 12186-93.
- Landry, S. J., Jordan, R., McMacken, R. and Gierasch, L. M. (1992). "Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL." *Nature* **355**(6359): 455-7.
- Lang, K., Schmid, F. X. and Fischer, G. (1987). "Catalysis of protein folding by prolyl isomerase." *Nature* **329**: 268-270.
- Lazar, S. W. and Kolter, R. (1996). "SurA assists the folding of Escherichia coli outer membrane proteins." *J.Bacteriol.* **178**(6): 1770-1773.
- Lee, H. C. and Bernstein, H. D. (2002). "Trigger factor retards protein export in Escherichia coli." *J Biol Chem* **277**(45): 43527-35.
- Levinthal, C. J. (1968). "Are there pathways for protein folding?" *J. Chim. Phys.* **65**: 44-45.
- Levinthal, C. J. (1969). How to fold gracefully. Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings, Allerton House, University of Illinois.
- Li, Z. Y., Liu, C. P., Zhu, L. Q., Jing, G. Z. and Zhou, J. M. (2001). "The chaperone activity of trigger factor is distinct from its isomerase activity during co-expression with adenylate kinase in Escherichia coli." *Febs Letters* **506**(2): 108-112.
- Lill, R., Crooke, E., Guthrie, B. and Wickner, W. (1988). "The "trigger factor cycle" includes ribosomes, presecretory proteins, and the plasma membrane." *Cell* **54**: 1013-1018.
- Lin, L.-N., Hasumi, H. and Brandts, J. F. (1988). "Catalysis of proline isomerization during protein folding reactions." *Biochim. Biophys. Acta* **956**: 256-266.
- Liu, C. P., Perrett, S. and Zhou, J. M. (2005). "Dimeric trigger factor stably binds folding-competent intermediates and cooperates with the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system to allow refolding." *J Biol Chem* **280**(14): 13315-20.

- Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S. L. (1991). "Calcineurin Is a Common Target of Cyclophilin-Cyclosporin- A and FKBP-FK506 Complexes." *Cell* **66**(4): 807-815.
- Lloyd, R. G. and Buckman, C. (1985). "Identification and genetic analysis of sbcC mutations in commonly used recBC sbcB strains of *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* **164**(2): 836-44.
- Lu, K. P., Hanes, S. D. and Hunter, T. (1996). "A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis." *Nature* **380**(6574): 544-547.
- Lu, P. J., Zhou, X. Z., Shen, M. and Lu, K. P. (1999). "Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules." *Science* **283**(5406): 1325-8.
- Ludlam, A. V., Moore, B. A. and Xu, Z. (2004). "The crystal structure of ribosomal chaperone trigger factor from *Vibrio cholerae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(37): 13436-41.
- Lyubchenko, Y. L., Kim, B. H., Krasnoslobodtsev, A. V. and Yu, J. (2010). "Nanoimaging for protein misfolding diseases." *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2**(5): 526-43.
- MacArthur, M. W. and Thornton, J. M. (1991). "Influence of proline residues on protein conformation." *J Mol Biol* **218**(2): 397-412.
- Maier, R. (1998). Diplomarbeit: Wechselwirkung des Triggerfaktors aus *Escherichia coli* mit Substratproteinen. *Laboratorium für Biochemie*, Universität Bayreuth.
- Maratea, D., Young, K. and Young, R. (1985). "Deletion and fusion analysis of the phage phi X174 lysis gene E." *Gene* **40**(1): 39-46.
- Martinez-Oyanedel, J., Choe, H.-W., Heinemann, U. and Saenger, W. (1991). "Ribonuclease T1 with free recognition and catalytic site: crystal structure analysis at 1.5 Å resolution." *Journal of Molecular Biology* **222**: 335-352.
- Martino, L., He, Y., Hands-Taylor, K. L., Valentine, E. R., Kelly, G., Giancola, C. and Conte, M. R. (2009). "The interaction of the *Escherichia coli* protein SlyD with nickel ions illuminates the mechanism of regulation of its peptidyl-prolyl isomerase activity." *Febs J* **276**(16): 4529-44.
- Matthews, C. R. (1993). "Pathways of Protein Folding." *Annual Review of Biochemistry* **62**: 653-683.
- Mayr, L. M., Odefey, C., Schutkowski, M. and Schmid, F. X. (1996). "Kinetic analysis of the unfolding and refolding of ribonuclease T1 by a stopped-flow double-mixing technique." *Biochemistry* **35**: 5550-5561.
- Mayr, L. M. and Schmid, F. X. (1993a). "Kinetic models for unfolding and refolding of ribonuclease T1 with substitution of cis proline 39 by alanine." *J. Mol. Biol.* **231**: 913-926.
- Mayr, L. M. and Schmid, F. X. (1993b). "A purification method for labile variants of ribonuclease T1." *Protein Expression and Purification* **4**: 52-58.
- Mayr, L. M., Willbold, D., Rösch, P. and Schmid, F. X. (1994). "Generation of a non-prolyl cis peptide bond in ribonuclease T-1." *Journal of Molecular Biology* **240**: 288-293.
- Michnick, S. W., Rosen, M. K., Wandless, T. J., Karplus, M. and Schreiber, S. L. (1991). "Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin." *Science* **252**: 836-842.
- Missiakas, D., Betton, J. M. and Raina, S. (1996). "New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH." *Mol.Microbiol.* **21**(4): 871-884.
- Mitterauer, T., Nanoff, C., Ahorn, H., Freissmuth, M. and Hohenegger, M. (1999). "Metal-dependent nucleotide binding to the *Escherichia coli* rotamase SlyD." *Biochem J* **342** (Pt 1): 33-9.
- Miyashita, H., Uchida, T., Mori, S., Echigo, S. and Motegi, K. (2003). "Expression status of Pin1 and cyclins in oral squamous cell carcinoma: Pin1 correlates with Cyclin D1 mRNA expression and clinical significance of cyclins." *Oncology reports* **10**(4): 1045-8.
- Moore, J. M., Peattie, D. A., Fitzgibbon, J. and Thomson, J. A. (1991). "Solution structure of the major binding protein for the immunosuppressant FK506." *Nature* **351**: 248-250.
- Mücke, M. and Schmid, F. X. (1994a). "Folding mechanism of ribonuclease T1 in the absence of the disulfide bonds." *Biochemistry* **33**(48): 14608-14619.
- Mücke, M. and Schmid, F. X. (1994b). "Intact disulfide bonds decelerate the folding of ribonuclease T1." *Journal of Molecular Biology* **239**: 713-725.
- Mücke, M. and Schmid, F. X. (1994c). "A kinetic method to evaluate the two-state character of solvent- induced protein denaturation." *Biochemistry* **33**(43): 12930-12935.
- Mukherjee, S., Shukla, A. and Guptasarma, P. (2003). "Single-step purification of a protein-folding catalyst, the SlyD peptidyl prolyl isomerase (PPI), from cytoplasmic extracts of *Escherichia coli*." *Biotechnol Appl Biochem* **37**(Pt 2): 183-6.
- Neu, H. C. and Heppel, L. A. (1965). "The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts." *J Biol Chem* **240**(9): 3685-92.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H. and Yura, T. (2000). "Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*." *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(3): 884-889.

- Norrby, E., Biberfeld, G., Chiodi, F., von Gegerfeldt, A., Naucler, A., Parks, E. and Lerner, R. (1987). "Discrimination between antibodies to HIV and to related retroviruses using site-directed serology." *Nature* **329**(6136): 248-50.
- Ornstein, L. (1964). "Disc electrophoresis. I. Background and theory." *Ann.NY Acad.Sci.* **121**: 321-349.
- Pace, C. N. (1986). "Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves." *Methods in Enzymology* **131**: 266-280.
- Pace, C. N. and Grimsley, G. R. (1988). "Ribonuclease T1 is stabilized by cation and anion binding." *Biochemistry* **27**(9): 3242-6.
- Pace, C. N., Grimsley, G. R., Thomson, J. A. and Barnett, B. J. (1988). "Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds." *Journal of Biological Chemistry* **263**: 11820-11825.
- Patzelt, H., Kramer, G., Rauch, T., Schönfeld, H. J., Bukau, B. and Deuerling, E. (2002). "Three-state equilibrium of Escherichia coli trigger factor." *Biol Chem* **383**(10): 1611-9.
- Patzelt, H., Rüdiger, S., Brehmer, D., Kramer, G., Vorderwülbecke, S., Schaffitzel, E., Waitz, A., Hesterkamp, T., Dong, L., Schneider-Mergener, J., Bukau, B. and Deuerling, E. (2001). "Binding specificity of Escherichia coli trigger factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14244-14249.
- Piette, F., D'Amico, S., Struvay, C., Mazzucchelli, G., Renaut, J., Tutino, M. L., Danchin, A., Leprince, P. and Feller, G. (2010). "Proteomics of life at low temperatures: trigger factor is the primary chaperone in the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125." *Mol Microbiol* **76**(1): 120-32.
- Pinto, D., Duarte, M., Soares, S., Tropschug, M. and Videira, A. (2008). "Identification of all FK506-binding proteins from *Neurospora crassa*." *Fungal Genet Biol* **45**(12): 1600-7.
- Qiagen (1997). QIAexpressionist: Handbook for high-level-expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Qiagen, Hilden.
- Quaas, R., McKeown, Y., Stanssens, P., Frank, R., Blöcker, H. and Hahn, U. (1988). "Expression of the chemically synthesized gene for ribonuclease T1 in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector." *European Journal of Biochemistry* **173**: 617-622.
- Rahfeld, J.-U., Schierhorn, A., Mann, K.-H. and Fischer, G. (1994a). "A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*." *FEBS Letters* **343**: 65-69.
- Rahfeld, J. U., Rücknagel, K. P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K. and Fischer, G. (1994b). "Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases - Amino acid sequence and recombinant production of parvulin." *FEBS Letters* **352**: 180-184.
- Ramachandran, G. N. and Mitra, A. K. (1976). "An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides." *J. Mol. Biol.* **107**: 85-92.
- Ramm, K. and Plückthun, A. (2000). "The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA - II. Isomerase-independent chaperone activity in vitro." *Journal of Biological Chemistry* **275**(22): 17106-17113.
- Ramm, K. and Plückthun, A. (2001). "High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric *E. coli* peptidyl-prolyl-isomerase FkpA." *J Mol Biol* **310**(2): 485-98.
- Randall, L. L. and Hardy, S. J. S. (1995). "High selectivity with low specificity: How SecB has solved the paradox of chaperone binding." *Trends.Biochem.Sci.* **20**(2): 65-70.
- Rassow, J. and Pfanner, N. (1996). "Protein biogenesis - Chaperones for nascent polypeptides." *Curr.Biol.* **6**(2): 115-118.
- Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M. and Fischer, G. (1998). "Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation." *J Mol Biol* **279**(2): 449-60.
- Riboldi-Tunnicliffe, A., König, B., Jessen, S., Weiss, M. S., Rahfeld, J., Hacker, J., Fischer, G. and Hilgenfeld, R. (2001). "Crystal structure of Mip, a prolylisomerase from *Legionella pneumophila*." *Nature Structural Biology* **8**(9): 779-783.
- Roder, H., Elöve, G. A. and Englander, S. W. (1988). "Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by hydrogen exchange labelling and proton NMR." *Nature*(335): 700-704.
- Roth, R. A. and Pierce, S. B. (1987). "In vivo cross-linking of protein disulfide isomerase to immunoglobulins." *Biochemistry* **26**(14): 4179-82.
- Rouviere, P. E. and Gross, C. A. (1996). "SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins." *Gene Develop.* **10**(24): 3170-3182.
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneidermergener, J. and Bukau, B. (1997). "Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries." *EMBO Journal* **16**(7): 1501-1507.
- Rutkowska, A., Mayer, M. P., Hoffmann, A., Merz, F., Zachmann-Brand, B., Schaffitzel, C., Ban, N., Deuerling, E. and Bukau, B. (2008). "Dynamics of trigger factor interaction with translating ribosomes." *J Biol Chem* **283**(7): 4124-32.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Sanders, S. L., Whitfield, K. M., Vogel, J. P., Rose, M. D. and Schekman, R. W. (1992). "Sec61p and BiP Directly Facilitate Polypeptide Translocation into the ER." *Cell* **69**(2): 353-365.
- Saul, F. A., Arie, J. P., Vulliez-le Normand, B., Kahn, R., Betton, J. M. and Bentley, G. A. (2004). "Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity." *J Mol Biol* **335**(2): 595-608.
- Scherer, G., Kramer, M. L., Schutkowski, M., U., R. and Fischer, G. (1998). "Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds." *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 5568-5574.
- Schiene-Fischer, C., Habazettl, J., Schmid, F. X. and Fischer, G. (2002). "The hsp70 chaperone DnaK is a secondary amide peptide bond cis-trans isomerase." *Nat Struct Biol* **9**(6): 419-24.
- Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. A. and Schmid, F. X. (1995). "Extremely rapid folding in the absence of intermediates: the cold-shock protein from *Bacillus subtilis*." *Nature Structural Biology* **2**: 663-673.
- Schlünzen, F., Wilson, D. N., Tian, P., Harms, J. M., McInnes, S. J., Hansen, H. A., Albrecht, R., Buerger, J., Wilbanks, S. M. and Fucini, P. (2005). "The binding mode of the trigger factor on the ribosome: implications for protein folding and SRP interaction." *Structure* **13**(11): 1685-94.
- Schmid, F. X. (1993). "Prolyl Isomerase - Enzymatic Catalysis of Slow Protein-Folding Reactions." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **22**: 123-143.
- Schmid, F. X. and Baldwin, R. L. (1978). "Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 4764-4768.
- Schmid, F. X. and Blaschek, H. (1981). "A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 2. Comparison of its properties to native ribonuclease A." *Eur. J. Biochem.* **114**: 111-117.
- Scholz, C., Eckert, B., Hagn, F., Schaarschmidt, P., Balbach, J. and Schmid, F. X. (2006). "SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities." *Biochemistry* **45**(1): 20-33.
- Scholz, C., Maier, P., Dolinski, K., Heitman, J. and Schmid, F. X. (1999). "R73A and H144Q mutants of the yeast mitochondrial cyclophilin Cpr3 exhibit a low prolyl isomerase activity in both peptide and protein-folding assays." *FEBS Letters* **443**(3): 367-369.
- Scholz, C., Mücke, M., Rape, M., Pecht, A., Pahl, A., Bang, H. and Schmid, F. X. (1998). "Recognition of protein substrates by the prolyl isomerase trigger factor is independent of proline residues." *J. Mol. Biol.* **277**: 723-732.
- Scholz, C., Schaarschmidt, P., Engel, A. M., Andres, H., Schmitt, U., Faatz, E., Balbach, J. and Schmid, F. X. (2005). "Functional solubilization of aggregation-prone HIV envelope proteins by covalent fusion with chaperone modules." *J Mol Biol* **345**(5): 1229-41.
- Scholz, C., Schindler, T., Dolinski, K., Heitman, J. and Schmid, F. X. (1997a). "Cyclophilin active-site mutants have native prolyl isomerase activity with a protein substrate." *FEBS Lett.* **414**: 69-73.
- Scholz, C., Stoller, G., Zarnt, T., Fischer, G. and Schmid, F. X. (1997b). "Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding." *EMBO Journal* **16**: 54-58.
- Scholz, C., Thirault, L., Schaarschmidt, P., Zarnt, T., Faatz, E., Engel, A. M., Upmeyer, B., Bollhagen, R., Eckert, B. and Schmid, F. X. (2008). "Chaperone-aided in vitro renaturation of an engineered E1 envelope protein for detection of anti-Rubella virus IgG antibodies." *Biochemistry* **47**(14): 4276-87.
- Scholz, C. J. (1999). Dissertation: Faltungskatalyse durch Prolylisomerasen *Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften*, Universität Bayreuth.
- Schönbrunner, E. R. and Schmid, F. X. (1992). "Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase Improves the Efficiency of Protein Disulfide Isomerase as a Catalyst of Protein Folding." *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**(10): 4510-4513.
- Schreiber, C., Buckle, A. M. and Fersht, A. R. (1994). "Stability and function: Two constraints in the evolution of barstar and other proteins." *Structure.* **2**(10): 945-951.
- Schwabe, U. and Paffrath, D. (2009). *Arzneiverordnungs-Report 2009: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Heidelberg
- Seckler, R. and Jaenicke, R. (1992). "Protein Folding and Protein Refolding." *FASEB J.* **6**(8): 2545-2552.
- Shen, M., Stukenberg, P. T., Kirschner, M. W. and Lu, K. P. (1998). "The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins." *Genes Dev* **12**(5): 706-20.
- Sieber, V. (1998). Dissertation: Entwicklung eines evolutiven Verfahrens zur Erhöhung der Stabilität von Proteinen. *Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften*, Universität Bayreuth.
- Siekierka, J. J., Hung, S. H. Y., Poe, M., Lin, C. S. and Sigal, N. H. (1989). "A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin." *Nature* **341**: 755-757.

- Sigal, N. H., Dumont, F., Durette, P., Siekierka, J. J., Peterson, L., Rich, D. H., Dunlap, B. E., Staruch, M. J., Melino, M. R., Koprak, S. L., Williams, D., Witzel, B. and Pisano, J. M. (1991). "Is Cyclophilin Involved in the Immunosuppressive and Nephrotoxic Mechanism of Action of Cyclosporin-A." *J.Exp.Med.* **173**(3): 619-628.
- Solscheid, B. and Tropschug, M. (2000). "A novel type of FKBP in the secretory pathway of *Neurospora crassa*." *FEBS Lett* **480**(2-3): 118-22.
- Spedding, G. (1990). Isolation and analysis of ribosomes from prokaryotes, eukaryotes and organelles. *Ribosomes and Protein Synthesis, a Practical Approach*. G. Spedding. Oxford, IRL Press: 1-30.
- Stein, R. L. (1993). "Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis- trans isomerization." *Advances in Protein Chemistry* **44**: 1-24.
- Stewart, D. E., Sarkar, A. and Wampler, J. E. (1990). "Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures." *Journal of Molecular Biology* **214**: 253-260.
- Stirling, P. C., Bakhoun, S. F., Feigl, A. B. and Leroux, M. R. (2006). "Convergent evolution of clamp-like binding sites in diverse chaperones." *Nat Struct Mol Biol* **13**(10): 865-70.
- Stoller, G., Rücknagel, K. P., Nierhaus, K. H., Schmid, F. X., Fischer, G. and Rahfeld, J. U. (1995). "A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis/trans isomerase identified as the trigger factor." *Embo J* **14**(20): 4939-48.
- Stoller, G., Tradler, T., Rücknagel, J.-U. and Fischer, G. (1996). "An 11.8 kDa proteolytic fragment of the E. coli trigger factor represents the domain carrying the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity." *FEBS Letters* **384**: 117-122.
- Suno, R., Taguchi, H., Masui, R., Odaka, M. and Yoshida, M. (2004). "Trigger factor from *Thermus thermophilus* is a Zn²⁺-dependent chaperone." *J Biol Chem* **279**(8): 6380-4.
- Suzuki, R., Nagata, K., Yumoto, F., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani, M., Adachi, K., Maruyama, T. and Tanokura, M. (2003). "Three-dimensional solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of peptidyl prolyl cis-trans isomerase and chaperone-like activities." *J Mol Biol* **328**(5): 1149-60.
- Takahashi, K., Uchida, T. and Egami, F. (1970). "Ribonuclease T1: structure and function." *Adv. Biophys.* **1**: 53-98.
- Teter, S. A., Houry, W. A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C. and Hartl, F. U. (1999). "Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains." *Cell* **97**(6): 755-65.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res* **22**(22): 4673-80.
- Thrall, S. H., Reinstein, J., Wöhr, B. M. and Goody, R. S. (1996). "Evaluation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase primer tRNA binding by fluorescence spectroscopy: specificity and comparison to primer/template binding." *Biochemistry* **35**(14): 4609-4618.
- Topping, T. B. and Randall, L. L. (1997). "Chaperone SecB from *Escherichia coli* mediates kinetic partitioning via a dynamic equilibrium with its ligands." *J Biol Chem* **272**(31): 19314-8.
- Tormo, A., Almiron, M. and Kolter, R. (1990). "surA, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase." *J Bacteriol* **172**(8): 4339-47.
- Tremmel, D., Duarte, M., Videira, A. and Tropschug, M. (2007). "FKBP22 is part of chaperone/folding catalyst complexes in the endoplasmic reticulum of *Neurospora crassa*." *FEBS Lett* **581**(10): 2036-40.
- Tremmel, D. and Tropschug, M. (2007). "*Neurospora crassa* FKBP22 is a novel ER chaperone and functionally cooperates with BiP." *J Mol Biol* **369**(1): 55-68.
- Udgaonkar, J. B. and Baldwin, R. L. (1988). "NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A." *Nature* **335**: 694-699.
- Valent, Q. A., Kendall, D. A., High, S., Kusters, R., Oudega, B. and Lührink, J. (1995). "Early events in preprotein recognition in E. coli: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides." *Embo J* **14**(22): 5494-505.
- Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Schreiber, S. L. and Clardy, J. (1991). "Atomic Structure of the Rapamycin Human Immunophilin FKBP- 12 Complex." *J.Am.Chem.Soc.* **113**(19): 7433-7434.
- Walter, S., Lorimer, G. H. and Schmid, F. X. (1996). "A thermodynamic coupling mechanism for GroEL-mediated unfolding." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(18): 9425-9430.
- Wang, J. J., Steel, S., Wisniewski, R. and Wang, C. Y. (1986). "Detection of antibodies to human T-lymphotropic virus type III by using a synthetic peptide of 21 amino acid residues corresponding to a highly antigenic segment of gp41 envelope protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(16): 6159-63.
- Wang, Y. and King, J. A. (2010). "Cataract as a Protein-Aggregation Disease." *Protein Misfolding Diseases: Current and Emerging Principles and Therapies*: 487-515.

- Watts, K. M. and Hunstad, D. A. (2008). "Components of SurA required for outer membrane biogenesis in uropathogenic *Escherichia coli*." *PLoS One* **3**(10): e3359.
- Weininger, U., Haupt, C., Schweimer, K., Graubner, W., Kovermann, M., Brüser, T., Scholz, C., Schaarschmidt, P., Zoldak, G., Schmid, F. X. and Balbach, J. (2009). "NMR Solution Structure of SlyD from *Escherichia coli*: Spatial Separation of Prolyl Isomerase and Chaperone Function." *Journal Of Molecular Biology* **387**(2): 295-305.
- West, S. M., Kelly, S. M. and Price, N. C. (1990). "The unfolding and attempted refolding of citrate synthase from pig heart." *Biochim Biophys Acta* **1037**(3): 332-6.
- Wilson, K. P., Yamashita, M. M., Sintchak, M. D., Rotstein, S. H., Murcko, M. A., Boger, J., Thomson, J. A., Fitzgibbon, M. J., Black, J. R. and Navia, M. A. (1995). "Comparative X-ray structures of the major binding protein for the immunosuppressant FK506 (tacrolimus) in unliganded form and in complex with FK506 and rapamycin." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **51**(Pt 4): 511-21.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. and Graham, M. W. (1989). "Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants." *Nucleic Acids Res* **17**(9): 3469-78.
- Wülfing, C., Lombardero, J. and Plückthun, A. (1994). "An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506- binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif." *J Biol Chem* **269**(4): 2895-901.
- Xie, J. B. and Zhou, J. M. (2008). "Trigger factor assisted folding of green fluorescent protein." *Biochemistry* **47**(1): 348-57.
- Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M. H., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J. U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M. W., Fischer, G., Cantley, L. C. and Lu, K. P. (1997). "Sequence-Specific and Phosphorylation-Dependent Proline Isomerization - a Potential Mitotic Regulatory Mechanism." *Science* **278**(5345): 1957-1960.
- Zamenhof, P. J. and Villarejo, M. (1972). "Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting - complementation of -galactosidase fragments in vivo." *J Bacteriol* **110**(1): 171-8.
- Zarnt, T., Tradler, T., Stoller, G., Scholz, C., Schmid, F. X. and Fischer, G. (1997). "Modular structure of the trigger factor required for high activity in protein folding." *J. Mol. Biol.* **271**: 827-837.
- Zoldak, G., Aumüller, T., Lücke, C., Hritz, J., Oostenbrink, C., Fischer, G. and Schmid, F. X. (2009). "A library of fluorescent peptides for exploring the substrate specificities of prolyl isomerases." *Biochemistry* **48**(43): 10423-36.

10. Anhang

In dieser Arbeit wurden einige Proteinkonstrukte verwendet, die so nicht natürlich vorkommen. Dies betrifft insbesondere mehrere der Konstrukte von Roche Diagnostics. Daher werden hier die Aminosäuresequenzen dieser Konstrukte im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Abweichungen von der natürlichen Sequenz sind rot gekennzeichnet. Nicht aufgeführt sind Varianten natürlicher Proteine, die lediglich Punktmutationen tragen (z.B. TF W151F).

SlyD*:

entspricht SlyD (1-165)-**His₆**

```
1 MKVAKDLVVSLAYQVRTEDGVLVDESPVSAPLDYLGHGSLISGLETALE
51 GHEVGDKFDVAVGANDAYGQYDENLVQRVPKDVFMGVDELQVGMFLAET
101 DQGPVPVEITAVEDDHVVVDGNHMLAGQNLKFNVEVVAIREATEEEELAHG
151 HVHGAHDHHDHHDHHHHHHH
```

scSlyD*₂:

entspricht EcSlyD(1-165)-**Linker**-EcSlyD(1-165)-**Linker-His₆**

```
1 MKVAKDLVVSLAYQVRTEDGVLVDESPVSAPLDYLGHGSLISGLETALE
51 GHEVGDKFDVAVGANDAYGQYDENLVQRVPKDVFMGVDELQVGMFLAET
101 DQGPVPVEITAVEDDHVVVDGNHMLAGQNLKFNVEVVAIREATEEEELAHG
151 HVHGAHDHHDHHDHGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGKVAKDLVVSLAY
201 QVRTEDGVLVDESPVSAPLDYLGHGSLISGLETALEGHEVGDKFDVAVG
251 ANDAYGQYDENLVQRVPKDVFMGVDELQVGMFLAETDQGPVPVEITAVE
301 DDHVVDGNHMLAGQNLKFNVEVVAIREATEEEELAHGHVHGAHDHHDH
351 HDGGGSGGGLEHHHHHH
```

FkpA:

entspricht FkpA-**PWLE-His₆**

```
1 MAEEAAKPATTADSKAAAFKNDDQKSAYALGASLGRYMENSLKEQEKLGIKL
51 DKDQLIAGVQDAFADKSKLSDQEIEQTLQAFEARVKSSAQAKMEKDAADN
101 EAKGKEYREKFAKEKGVKTSSTGLVYQVVEAGKGEAPKDSDTVVVNYKGT
151 LIDGKEFDNSYTRGEPLSFRLDGVIPGWTEGLKNIKKGGKIKLVIPPELA
201 YGKAGVPGIIPPNSTLVFDVELLDVKPAPKADAKPEADAKAADSAKKPWLE
251 HHHHHH
```

scFkpA₂:entspricht FkpA-*Linker*-FkpA-**LE-His₆**

1 MAEAAKPATTADSKAAAFKNDDQKSAYALGASLGRYMENSLKEQEKLGIKL
 51 DKDQLIAGVQDAFADKSKLSDQEIEQTLQAFEARVKSSAQAKMEKDAADN
 101 EAKGKEYREKFAKEKGVKTSSTGLVYQVVEAGKGEAPKDSDTVVVNYKGT
 151 LIDGKEFDNSYTRGEPLSFRLDGVIPGWTEGLKNIKKGGKIKLVIPPELA
 201 YGKAGVPGIIPPNSTLVFDVELLDVKPAPKADAKPEADAKAADS**AKKGGGS**
 251 **GGGSGGGSGGG**AEAAKPATTADSKAAAFKNDDQKSAYALGASLGRYMENSL
 301 KEQEKLGIKLDKDQLIAGVQDAFADKSKLSDQEIEQTLQAFEARVKSSAQ
 351 AKMEKDAADNEAKGKEYREKFAKEKGVKTSSTGLVYQVVEAGKGEAPKDS
 401 DTVVVNYKGT LIDGKEFDNSYTRGEPLSFRLDGVIPGWTEGLKNIKKGGK
 451 IKLVIPPELAYGKAGVPGIIPPNSTLVFDVELLDVKPAPKADAKPEADAKA
 501 ADS**GKKLEHHHHHH**

MBP-gp41^{*}-FkpA:entspricht *T. maritima*-MBP(20-393)- gp41(532-681; **6 mut**)-*Linker*-FkpA

1 **M**QTKLTIWSSEKQVDILQKLGEFEKAKYGIPEVQYVDFGSIKSKFLTAA
 51 PQGQGADIIVGAHDWVGELAVNGLIEPIPNFSDLKNFYDTALKAFSYGGK
 101 LYGVPIYAMEAVALIYNKDYSVPKTMDELIEKAKQIDEEYGGEVRGFIY
 151 DVANFYFSAPFILGYGGYVFKETPQGLDVTDIGLANEGAVKGAKLIKRM
 201 DEGVLTTPGDNYGTMDSMFKEGLAAMIINGLWAIKSYKDAGINYGVAPIPE
 251 LEPGVPAKPFVGVQGFMINAKSPNKVIAMEFLTNFIARKETMYKIYLA
 301 RLPARKDVLELVKDNPDVVAFTQSASMGTPMPNVPEMAPVWSAMGDALSI
 351 **I**INGQASVEDALKEAVEK**I**KAQ**I**EKA**A**AMTLTVQARQLLSG**E**VQQEN**EL**
 401 RAIEAQQH**LE**QLTVWG**T**KQLQAR**E**LAVERYLKDQQLGIWGCSGKLICTT
 451 AVPWNASWSNKSLEQIWNNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKN
 501 EQELLELDKWASLWNWFNITNWLWY**GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGAE**
 551 **AAKPATTADSKAAAFKNDDQKSAYALGASLGRYMENSLKEQEKLGIKLDKD**
 601 **QLIAGVQDAFADKSKLSDQEIEQTLQAFEARVKSSAQAKMEKDAADNEAK**
 651 **GKEYREKFAKEKGVKTSSTGLVYQVVEAGKGEAPKDSDTVVVNYKGT LID**
 701 **GKEFDNSYTRGEPLSFRLDGVIPGWTEGLKNIKKGGKIKLVIPPELAYGK**
 751 **AGVPGIIPPNSTLVFDVELLDVKPAPKADAKPEADAKAADS**

Danksagung

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden von April 1998 bis August 2002 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Franz Xaver Schmid angefertigt. Ihm danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung und die zahlreichen Hilfestellungen in dieser Zeit. Mein besonderer Dank gilt ihm für die Bereitschaft, mich auch nach mehrjähriger wissenschaftlicher Absenz bei der Wiederaufnahme des Promotionsvorhabens zu unterstützen.

Bedanken möchte ich mich bei allen Laborkollegen im Gebäude B12 für die angenehme Arbeitsatmosphäre und das kooperative Miteinander. Ein extra „Dankeschön“ an Jochen Balbach, Volker Sieber, Andreas Martin, Dieter Perl und Barbara Eckert für anregende Diskussionen und gegenseitige Unterstützung im Laboralltag. Hervorheben möchte ich besonders Christian Scholz, der mir mit seinem umfangreichen Wissen im Bereich der Prolylisomerasen ein stets hilfreicher Ideengeber und Kooperationspartner war und mir später als Mitarbeiter von Roche Diagnostics zahlreiche interessante Enzyme zur Charakterisierung zukommen ließ.

Prof. Dr. Gunter Fischer, Gerlind Stoller, Mike Schutkowski, Hauke Lilie und Thomas Tradler (Martin-Luther-Universität Halle) danke ich für Probenmaterialien, Expressionsvektoren, Ultrazentrifugation und zahlreiche anregende Diskussionen, ebenso wie Prof. Dr. Maximilian Tropschug (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) für die FKBP22-Konstrukte.

Der European Molecular Biology Organisation danke ich für die Einladung zum „EMBO course on transient kinetics“ und besonders dem Kursbetreuer Jochen Reinstein (damals MPI Dortmund) für Hilfestellungen bei der Interpretation und Auswertung komplexer kinetischer Ergebnisse.

Dank auch an meine aktuellen Kollegen und Vorgesetzten Oskar Tropitzsch, Thomas Bruckdorfer und Steffen Tropitzsch für Antrieb und Unterstützung, nach so langer Unterbrechung diese Arbeit nochmals aufzunehmen und fertigzustellen.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Mutter für ihre langjährige Unterstützung und fürs gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit.

Versicherungen und Erklärungen

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

Waldershof, den 12. März 2014

